

ANÁLISIS DE RESIDUOS DE DISPARO POR CROMATOGRAFÍA DE GASES
CON DETECTOR SELECTIVO DE MASAS Y POR CROMATOGRAFÍA
ELECTROKINÉTICA MICELAR CON DETECTOR ULTRAVIOLETA

JOSÉ MANUEL MARTÍNEZ SOSA

UNIVERSIDAD DEL VALLE
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
SANTIAGO DE CALI
2012

ANÁLISIS DE RESIDUOS DE DISPARO POR CROMATOGRAFÍA DE GASES
CON DETECTOR SELECTIVO DE MASAS Y POR CROMATOGRAFÍA
ELECTROCINÉTICA MICELAR CON DETECTOR ULTRAVIOLETA

JOSÉ MANUEL MARTÍNEZ SOSA

Trabajo de investigación presentado como requisito parcial para optar al título de
Magíster en Ciencias Químicas

Directora, Martha Isabel Páez, Ph.D.

UNIVERSIDAD DEL VALLE
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
SANTIAGO DE CALI
2012

Nota de aceptación:

Este trabajo de grado ha sido aprobado en cumplimiento de los requisitos para optar al título de **Magister en Ciencias Química**

MARTHA ISABEL PAEZ MELO, Ph.D.
Directora

JUNIOR E. SANDOVAL
Jurado

GONZALO TABORDA OCAMPO
Jurado

Santiago de Cali, 11 de octubre de 2012

Dedicatoria

A Dios;

Por dirigir y guiar mis pasos.

Por darme más de una oportunidad,

Por premiarme con dos padres, una hermana y dos sobrinos maravillosos que son la fuente de inspiración y fuerza de cada día.

Por rodearme de gente tan maravillosa en esta experiencia de mi vida.

Por permitirme conocer muchas personas que de una u otra forma ayudaron a mi formación personal y profesional.

A mis padres;

Motores de mi vida, quienes siempre me han ofrecido su apoyo incondicional llenándome de fuerza, anhelos y consejos para ser siempre mejor, enseñándome desde pequeño a luchar para alcanzar mis metas.

Por siempre estar ahí, acompañándome ante los obstáculos que se presentaron, ayudándome y guiándome para aprender de mis errores lo que ha incidido en la persona que me he convertido.

A ambos le dedico este logro porque, en todos los ámbitos, han servido como inspiración para consolidar mis sueños y forjar un destino del que estarán orgullosos.

Por todos los esfuerzos y sacrificios que realizaron, todos mis logros y éxitos son suyos, ¡los amo!

Agradecimientos

Primeramente doy infinitamente gracias a Dios, por haberme dado fuerza y valor para terminar estos estudios de maestría.

A mi familia, por ser el centro de equilibrio de mi vida. Gracias porque con su apoyo y comprensión durante todo este trayecto han contribuido positivamente para culminar esta trascendental etapa.

A mi profesora Martha Isabel Paez, por su confianza y valioso aporte en mi estudio final. Gracias por ser mi mentora, por todo su apoyo, disponibilidad y sugerencias aportadas durante este viaje.

Al profesor Junior Sandoval por sus valiosos aportes hechos durante la revisión de éste trabajo de grado. También extensivo a su alumno Jorge E. Gómez por haberme instruido en el manejo del equipo de electroforesis capilar.

A la Fiscalía General de la Nación por el fundamental aporte material y económico proporcionado para la culminación del presente trabajo.

Al personal del grupo Balística del Cuerpo Técnico de Investigación, por estar siempre dispuestos a darme la mano con la provisión de cartuchos y la realización de los disparos.

A todos y cada una de las personas, que desinteresadamente realizaron disparos para obtener datos útiles en mi trabajo de investigación, gracias.

A mis amigos, compañeros de sueños, por compartir momentos tan maravillosos de amistad y comprensión en esta etapa de mi vida.

A los profesores del Departamento de Química que me asesoraron, porque cada uno, con sus valiosos aportes, contribuyó a mi crecimiento profesional y personal.

Finalmente, agradezco a mis compañeros de grupo, porque la constante comunicación con ellos ha contribuido en gran medida a transformar y mejorar mi forma de actuar en mi trabajo, especialmente a aquellos que me brindaron cariño, comprensión y apoyo, dándome con ello, momentos muy gratos.

Por todos estos mencionados y por los que no recuerdo mil y mil gracias.

CONTENIDO

	PÁG.
LISTA DE TABLAS	11
LISTA DE FIGURAS	13
GLOSARIO	15
RESUMEN	17
INTRODUCCIÓN	19
1. OBJETIVOS	21
1.1 OBJETIVO GENERAL	21
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
2. MARCO TEÓRICO Y ANTECEDENTES	23
2.1 TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA EL ANÁLISIS DE RESIDUOS DE DISPARO	26
2.1.1 Pruebas de coloración	26
2.1.2 Pruebas instrumentales	28
2.2 CONSIDERACIONES SOBRE LA ESPECIFICIDAD DEL ANÁLISIS DE RESIDUOS DE DISPARO	30
3. METODOLOGÍA	33
3.1 ANÁLISIS DE RESIDUOS ORGÁNICOS DE DISPARO POR GC/MS	33
3.1.1 Instrumental	33
3.1.2 Sustancias de referencia	33
3.1.3 Solventes	35
3.1.4 Gases empleados	35
3.1.5 Selección del solvente de extracción	35
3.1.6 Optimización de parámetros cromatográficos	35
3.1.7 Validación de parámetros cromatográficos	37
3.1.8 Aplicación de la metodología a muestras reales	39
3.2 ANÁLISIS DE RESIDUOS INORGÁNICOS DE DISPARO POR MEKC-UV	42

CONTENIDO

3.2.1	Sustancias de referencia	42
3.2.2	Reactivos	43
3.2.3	Instrumental	43
3.2.4	Procedimientos	44
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	45
4.1	ANÁLISIS DE RESIDUOS ORGÁNICOS DE DISPARO POR GC/MS	45
4.1.1	Selección del solvente de extracción	45
4.1.2	Optimización de parámetros cromatográficos	46
4.1.3	Validación de parámetros cromatográficos	58
4.1.4	Aplicación de la metodología a muestras reales	68
4.2	ANÁLISIS DE RESIDUOS INORGÁNICOS DE DISPARO POR MEKC-UV	78
4.2.1	Selección de los parámetros para la separación electroforética	78
5.	CONCLUSIONES	85
6.	ANEXO I	87
7.	ANEXO II	93
8.	ANEXO III	95
9.	ANEXO IV	97
10.	ANEXO IV	101
10.1	Parámetros de calidad	101
10.2	Linealidad	102
10.3	Límites de detección y cuantificación (LD y LC)	106
10.4	Evaluación de la exactitud	107
11.	ANEXO V	115
	BIBLIOGRAFÍA	117

LISTA DE TABLAS

	PÁG.
Tabla 1	Listado de sustancias analizadas por GC/MS. 34
Tabla 2	Factores considerados para el diseño experimental de siete factores y dos niveles. 36
Tabla 3	Matriz de experimentos de siete factores y dos niveles. 36
Tabla 4	Cantidades empleadas para dopar los hisopos de algodón y concentración final obtenida al realizar la posterior extracción y ajuste de volumen a 2 mL para los cuatro niveles de concentración escogidos. 38
Tabla 5	Tipos de munición estudiada. 39
Tabla 6	Armas de fuego empleadas en este estudio. 40
Tabla 7	Efectos estimados para cada uno de los factores que afectan el área del pico cromatográfico. 47
Tabla 8	Matriz de experimentos diseño Doehlert. 51
Tabla 9	Factores considerados para el diseño experimental Doehlert de cuatro factores. 51
Tabla 10	Matriz de experimentos diseño Doehlert. X1: Presión de columna, X2: tiempo de presurizado. 53
Tabla 11	Matriz de experimentos diseño Doehlert. X1: Presión de columna, X2: tiempo de presurizado. 54
Tabla 12	Condiciones automuestreador. 57
Tabla 13	Condiciones optimizadas del puerto de inyección. 57
Tabla 14	Programación de temperaturas del horno. 57
Tabla 15	Condiciones optimizadas del detector selectivo de masas. 58
Tabla 16	Parámetros indicadores de la la calidad de la separación cromatográfica (n=10). 59
Tabla 17	Parámetros de regresión de los modelos polinómico y lineal. 62

LISTA DE TABLAS

Tabla 18	Comparación entre los límites de detección y cuantificación obtenidos por los métodos empleados (volumen de inyección 2 μ L).	65
Tabla 19	Estimación de la repetibilidad, precisión intermedia y del sesgo de laboratorio para la NG, DFA y EC.	66
Tabla 20	Composición establecida para las pólvoras de la munición disponible.	68
Tabla 21	Relación de áreas de los compuestos encontrados en cada tipo de munición analizada.	70
Tabla 22	Matriz de correlación de las relaciones de los componentes de las municiones analizadas.	71
Tabla 23	<i>Loadings</i> de las 5 componentes principales calculadas con las relaciones de áreas de pico de los cromatogramas de las municiones estudiadas.	71
Tabla 24	Compuestos encontrados en las muestras provenientes del frotis del dorso de la mano derecha de los voluntarios que realizaron disparos.	74
Tabla 25	Relación de áreas de los compuestos encontrados en cada residuo de disparo analizado.	75
Tabla 26	Matriz de correlación de las relaciones de los componentes de los residuos orgánicos de disparo analizados.	75
Tabla 27	<i>Loadings</i> de las 3 componentes principales calculadas con las relaciones de áreas de pico de los cromatogramas de los residuos de disparo estudiados.	76
Tabla 28	Condiciones seleccionadas para la separación de los complejos metal-CDTA por MEKC.	81
Tabla 29	Parámetros indicadores de la calidad del sistema electroforético (n=6).	81
Tabla 30	Parámetros indicadores de calidad del sistema electroforético con <i>stacking</i> (n=8).	83
Tabla 31	Comparación de los límites de detección obtenidos con inyección normal y preconcentración <i>stacking</i> .	84
Tabla 32	Análisis de la varianza ANOVA.	105
Tabla 33	Cuatro factores importantes y sus condiciones.	109

LISTA DE FIGURAS

	PÁG.
Figura 1	Desagregación de las muertes por armas en Colombia, 2004–2011. 20
Figura 2	Deposición de residuos de disparo. 23
Figura 3	Moldes de parafina para la prueba dérmica de nitratos (<i>Guantelete</i>). 27
Figura 4	Zonas de muestreo para residuos de disparo. A) Dorso. B) Palma de la mano. 41
Figura 5	Efecto del solvente empleado sobre la eficiencia de la extracción. 46
Figura 6	Gráficas de perfiles para la nitroglicerina y la difenilamina del diseño factorial de dos niveles con siete factores y como respuesta el área del pico cromatográfico. 48
Figura 7	Diagramas de Pareto y gráficas de distribución normal producida por el diseño factorial de dos niveles con siete factores y como respuesta el área del pico cromatográfico. 49
Figura 8	Gráficas de superficie 3D para la nitroglicerina y la difenilamina. a) temperatura del inyector – presión columna, b) presión columna – tiempo de presurizado. 52
Figura 9	Gráficas de superficie 3D diseño experimental rango expandido de presión de columna y tiempo de presurizado. 55
Figura 10	Optimización de la presión de columna y tiempo de presurizado para los componentes de las pólvoras sin humo. 56
Figura 11	Cromatograma TIC obtenido bajo las condiciones optimizadas. 58
Figura 12	a) TIC del extracto obtenido de los hisopos comerciales de vástago plástico. modo FASST, b) MIC del mismo extracto. 60
Figura 13	Cromatogramas MIC a) obtenido del frotis de una mano sin disparar. b) superposición con el cromatograma de la mezcla de patrones. 61
Figura 14	Curvas de calibración para la nitroglicerina, difenilamina y etilcentralita. 62
Figura 15	Gráficas de diagnóstico para la difenilamina. 63

LISTA DE FIGURAS

Figura 16	Relación entre s_r y $s_{I(T)}$ con la media de concentración para cada nivel evaluado.	67
Figura 17	Cromatogramas TIC de la pólvora de la munición a) 38 L Indumil y b) .357 Magnum Hirtenberger Patronen.	69
Figura 18	Gráfico Biplot del análisis de componentes principales CP1 y CP2 para las pólvoras de las municiones estudiadas. a) Variables originales con sus respectivos <i>loadings</i> b) las muestras según sus <i>scores</i> .	72
Figura 19	Ampliación de la escala de la Figura 18(b), zona en la que se ubican las municiones colombianas y mejicanas.	73
Figura 20	Cromatograma de un residuo de disparo proveniente de una pistola Smith Wesson con munición 9 mm Indumil.	74
Figura 21	Gráfico biplot del análisis de componentes principales CP1 y CP2 para los residuos de disparo estudiados. a) Variables originales con sus respectivos <i>loadings</i> b) las muestras según sus <i>scores</i> .	76
Figura 22	Variación de la altura del pico cromatográfico con respecto a la longitud de onda.	79
Figura 23	Efecto de la variación de la concentración del borato y del voltaje aplicado: a) 20 mM buffer borato y voltaje +30 KV, b) 40 mM buffer borato y voltaje +30 KV, c) 20 mM buffer borato y voltaje +25 KV.	80
Figura 24	Electrocromatograma de los complejos aniónicos metal-CDTA bajos las condiciones seleccionadas.	82
Figura 25	Electrocromatograma obtenido con pre-concentración <i>stacking</i> .	83

GLOSARIO

AAS	Espectroscopía de absorción atómica.
ASV	Voltametría de redisolución anódica.
BBFT	Ftalato de bencilbutilo.
CDTA	Ácido diaminociclohexanotetracético.
CE	Electroforesis capilar.
DAS	Departamento Administrativo de gefuridad.
DBFT	Ftalato de dibutilo.
DFA	Difenilamina.
DIBFT	Ftalato de diisobutilo.
DIPFT	Ftalato de diisopentilo.
DOFT	Ftalato de dioctilo.
DPASV	Voltametría de redisolución anódica de pulso diferencial.
EC	Etilcentralita.
EI	Impacto electrónico.
FASST	Modo de adquisición SCAN/SIM automatizado.
FBI	Federal bureau of Investigation.
GC/MS	Cromatografía de gases con detector selectivo de masas.
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficiencia.
ICP/MS	Espectrometría de masas con fuente de plasma de acoplamiento inductivo.
IPA	Isopropanol.
LC	Límite de cuantificación.
LD	Límite de detección.
MC	Metilcentralita.
MEKC	Cromatografía electrocinética micelar capilar.
MIC	Cromatograma de iones múltiples.
NA	Naftilamina.
NAA	Activación neutrónica.
NC	Nitrato de celulosa.
NG	Nitroglicerina.
NTC	Norma técnica de calidad.

GLOSARIO

PCA	Análisis de componentes principales.
PIXE	Emisión protónica inducida por rayos X.
SCAN	Modo de adquisición de barrido de iones.
SDS	Dodecilsulfato de sodio.
SEM/EDX	Microscopía de barrido electrónico con microcelda de dispersión de rayos X.
SIM	Modo de adquisición de monitoreo de ion seleccionado.
TIC	Cromatograma de iones totales.
USE	Extracción ultrasónica con solvente.

RESUMEN

El análisis de residuos de disparo es de gran interés cuando se conoce o sospecha el uso de armas de fuego en una actividad criminal, por lo que la detección e identificación de materiales residuales ocasionados durante el disparo pueden proporcionar información valiosa para establecer si un sospechoso disparó, o no, un arma de fuego; para determinar si un orificio fue causado por la entrada o salida de un proyectil o para estimar la distancia de disparo. Para afrontar la problemática ocasionada por el alto índice de homicidios por arma de fuego que afecta la región vallecaucana se requiere contar con metodologías específicas, económicas y al alcance de los laboratorios forenses locales que puedan usarse de manera rutinaria brindando resultados confiables que puedan ser utilizados por las autoridades judiciales.

En el presente trabajo se optimizó y validó una metodología por cromatografía de gases con detector selectivo de masas (GC/MS) para la separación, identificación y cuantificación de seis compuestos orgánicos presentes en la pólvora de la munición para armas de fuego. Esta metodología permitió alcanzar los niveles de detección suficientes para ser aplicada al análisis de residuos orgánicos de disparo en muestras reales constituyéndose en el primer estudio de este tipo realizado sobre los residuos originados por munición Indumil de fabricación colombiana. Adicionalmente, mediante la aplicación del análisis de componentes principales (PCA) fue posible diferenciar 19 tipos de munición como también muestras de residuos orgánicos de disparo.

También se describe una metodología por cromatografía electrocinética micelar capilar con detección ultravioleta (MEKC-UV) para el análisis de plomo, bario y antimonio en residuos de disparo. Infortunadamente, a pesar de haber utilizado la técnica de concentración on-line de stacking, el método no ofreció la sensibilidad requerida para aplicarse al estudio de muestras reales.

Palabras clave: *Residuos de disparo, ciencia forense, balística, GC/MS, MEKC.*

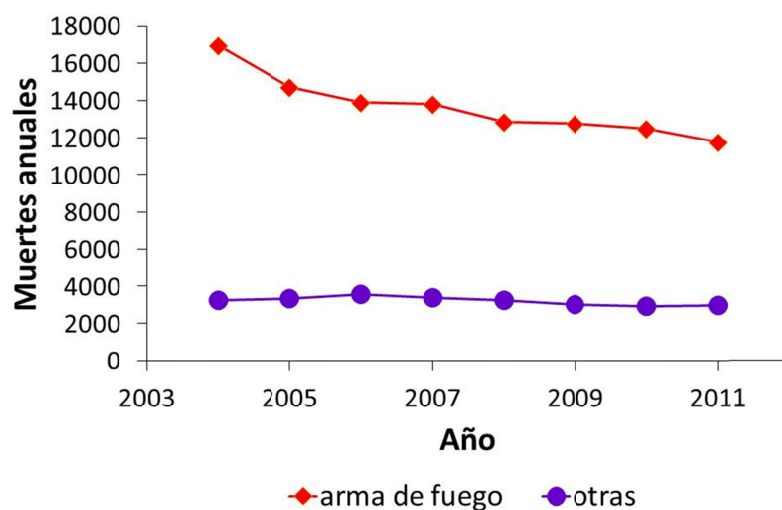
INTRODUCCIÓN

Las ciencias forenses incluyen un grupo amplio e interdisciplinario de aplicaciones en la justicia civil y penal de las ciencias (química, física y biología), así como una gran variedad de áreas como la psicología, patología, psiquiatría, entomología, antropología y odontología. La química analítica forense se define como una disciplina aplicada al análisis de las muestras encontradas en la escena del crimen, cuyas conclusiones desempeñan un rol trascendental en la toma de decisiones judiciales. Esta parte de las ciencias forenses se ocupa de la caracterización y de la cuantificación de sustancias químicas como: estupefacientes, explosivos, residuos de disparo, tintas, entre otros, que en la mayoría de los casos se encuentran a niveles traza.

Los análisis para determinar si un individuo recientemente ha disparado o ha manipulado un arma de fuego han sufrido considerables cambios desde sus inicios con la poco confiable prueba del guantelete hasta la microscopía de barrido electrónico con microcelda de dispersión de rayos X (SEM/EDX) y la espectrometría de masas con fuente de plasma de acoplamiento inductivo (ICP/MS). Esta dos últimas gozan actualmente de mayor aceptación para el análisis de residuos inorgánicos de disparo por su especificidad y sensibilidad pero presentan varias desventajas como el requerimiento de una instrumentación costosa; alta demanda de consumibles, mantenimiento y la necesidad de contar con personal altamente calificado; y la posibilidad de obtener falsos resultados negativos por la tendencia moderna a producir munición con fulminantes libres de metales pesados.

Por lo anterior, se requiere la implementación de metodologías rápidas, baratas y al alcance de los laboratorios forenses locales que den respuesta a las necesidades de la región y contribuyan a la administración de una justicia oportuna y eficaz disminuyendo el alto grado de impunidad. Ya que por años, en Colombia el prolongado conflicto armado, y la delincuencia común y organizada ha cobrando la vida de aproximadamente 135 mil civiles y combatientes entre 2004 y 2011 (casi 17.000 por año), de éstos homicidios más del 80% se cometieron con armas de fuego (Figura 1), lo que se ha configurado en una crisis de seguridad humana de dimensiones alarmantes¹.

Figura 1 Desagregación de las muertes por armas en Colombia, 2004–2011.



Fuente: 2011 *Global study on homicide*¹.

Para el caso particular de Santiago de Cali, durante el 2011 se presentaron 1.628 homicidios con arma de fuego lo que la ubica como la capital de departamento más violenta del país².

En el presente trabajo se evaluó la viabilidad de la aplicación de la GC/MS para el análisis de residuos orgánicos de disparo y de la MEKC-UV como técnicas alternativas rápidas, económicas y específicas que pueden usarse de manera rutinaria en el Laboratorio de Investigación Científica, de la Fiscalía General de la Nación ubicado en la ciudad de Cali.

1. OBJETIVOS

1.1 OBJETIVO GENERAL

Se plantea optimizar y validar metodologías cromatográficas y electroforéticas para el análisis de residuos de disparo y aplicarlas al estudio de muestras reales de tal manera que sirvan como alternativa a las técnicas tradicionales ofreciendo resultados confiables a bajo costo.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Optimizar los parámetros de GC/MS de tal manera que se puedan alcanzar los límites de detección necesarios para poder aplicar la metodología al estudio de residuos orgánicos de disparo en muestras reales. Adicionalmente validar la metodología para garantizar que cuenta con la confiabilidad y el rigor técnico científico necesarios para ser sustentada en los estrados judiciales.

Evaluar el método de preconcentración *stacking* en MEKC para poder alcanzar la sensibilidad requerida para el análisis de residuos inorgánicos en muestras reales.

Mediante el uso de PCA, establecer correlaciones entre los resultados analíticos obtenidos y las diferentes variables que pueden afectar la composición de los residuos de disparo.

Aplicar estas metodologías al estudio de elementos materiales probatorios recogidos en la escena de un delito que involucre armas de fuego.

2. MARCO TEÓRICO Y ANTECEDENTES

Las armas de fuego funcionan mediante un proceso químico-mecánico en el cual, la aguja percutora golpea contra el fulminante; este último contiene un producto químico explosivo que inicia la combustión de la pólvora (propelente), lo que genera grandes volúmenes de gases a alta temperatura y presión que empujan al proyectil hacia el exterior a través del cañón. Éste proceso genera cierto tipo de residuos que escapan en forma de vapor o “nube” a través de cualquier abertura disponible en el arma de fuego que, transcurrido un lapso de tiempo, se solidifican en los alrededores, incluyendo la mano de quien dispara, la víctima u objetivo y sus prendas de vestir y superficies circundantes. La cantidad de deposición está determinada por varios factores tales como el tipo y condición del arma, el número de disparos, la cantidad de lubricante, humedad o transpiración en la superficie de deposición, dirección y la fuerza de las corrientes de aire³.

En general, las pistolas y revólveres depositan más residuos sobre la mano que sujeta el arma de fuego (Figura 2) en comparación con la que no lo hizo, pero esto puede no ser siempre el caso, porque la concentración y/o la ubicación de los residuos de disparo depende de la postura del cuerpo y del tipo de agarre utilizado. Los residuos de disparo depositados sobre una persona se van perdiendo paulatinamente como resultado de las actividades normales que ésta realiza y como consecuencia, es difícil generalizar el período durante el cual los residuos de disparo se conservan.

Figura 2 Deposición de residuos de disparo.



Fuente: Truth in Justice <<http://truthinjustice.org/gunshot-residue.htm>>⁴

Estos residuos de disparo se producen bajo condiciones extremas y a la vez muy específicas y su proceso de formación puede dividirse en tres fases, la primera inicia una diezmilésima de segundo después que la aguja percutora del arma de fuego golpea el fulminante. La explosión resultante hace que la temperatura aumente entre 1500 °C y 2000 °C y la presión se incremente a 10^4 KPa, incremento que funde la mezcla del fulminante en unos pocos milisegundos al sobrepasar sus puntos de evaporación (Pb 1620 °C, Ba 1140 °C, Sb 1380 °C). La segunda fase inicia 0,5 milisegundos después con la deflagración del propelente ocasionando un segundo incremento de presión y temperatura alcanzando un máximo de 3600 °C y 3×10^5 KPa en un lapso de 0,5 ms a 0,75 ms. En la última fase se sobreviene un rápido enfriamiento durante el cual las partículas se condensan como pequeñas gotas con la subsecuente solidificación y deposición⁵.

Los componentes de los residuos resultantes del proceso de disparo se clasifican en dos categorías, los residuos orgánicos de disparo y los residuos inorgánicos de disparo.

Los residuos orgánicos de disparo se originan principalmente por la combustión completa e incompleta de la pólvora (propelente) presente en el cartucho. La mayoría de la munición comercial moderna emplea como mayor ingrediente oxidante nitrato de celulosa (NC) junto con otras sustancias químicas que son adicionadas para propósitos específicos como la nitroglicerina (NG), estabilizantes como la difenilamina (DFA) y plastificantes como el ftalato de dibutilo (DBFT).

Los propelentes que sólo contienen nitrocelulosa como oxidante se conocen como de base simple y los propelentes que contienen nitrocelulosa y nitroglicerina (o algún otro explosivo plastificante) como de base doble. Los propelentes de base triple, poco usados en municiones de armas pequeñas, se obtienen al adicionar cantidades sustanciales de un compuesto orgánico cristalino productor de energía, como la nitroguanidina, a un propelente de base doble.

Los residuos inorgánicos de disparo corresponden a partículas compuestas por plomo, bario y antimonio que se generan casi exclusivamente por la combustión de la mezcla

explosiva del fulminante, ubicado en la base del cartucho⁶. Las partículas de Pb-Ba-Sb generadas poseen una morfología característica y fueron clasificadas por Basu⁷ en:

- I. Esferoides regulares no cristalinas, cuyo tamaño oscila entre 0,5 μm y 5 μm compuestas por una mezcla uniforme y simultánea de Pb, Ba y Sb que representan el 68% del total de residuos de disparo en las manos de un tirador.
- II. Partículas irregulares, con una distribución discontinua de Pb, Ba, y Sb, formadas por la fusión de partículas de diferentes tamaños y corresponden al 25% de todas las partículas que se encuentran.
- III. Partículas con un núcleo homogéneo de Ba y Sb recubierto con una capa de plomo. Se cree que cuando el núcleo de Ba y Sb se encuentra en proceso de solidificación atrapa vapores de Pb provenientes de residuos quemados y desprendidos del proyectil al pasar por las estrías del cañón. Es el tipo de partícula menos frecuente.

La propiedad de diagnóstico principal para determinar si una partícula corresponde a un residuo de disparo es su composición elemental considerándose como “partículas características de residuo de disparo” aquellas compuestas por Pb-Ba-Sb y las compuestas por estos tres elementos acompañados por elementos como: aluminio, silicio, fósforo, trazas de azufre, cloro, potasio, calcio, trazas de hierro, níquel, cobre, cinc, circonio y estaño⁸.

Las “partículas consistentes con residuo de disparo” pueden asociarse con haber disparado un arma de fuego pero pueden originarse además por otras fuentes no relacionadas con la descarga de un arma de fuego. Pueden tener las siguientes composiciones: Ba-Ca-Si (con o sin trazas de azufre), Sb-Ba (con trazas de hierro o azufre), Pb-Sb, Ba-Al (con o sin trazas de azufre), Pb-Ba, solamente Pb (si está acompañado de las partículas con composiciones mencionadas anteriormente), solamente Sb (si está acompañado de las partículas con composiciones mencionadas anteriormente), solamente Ba (con o sin trazas de azufre)⁸.

2.1 TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA EL ANÁLISIS DE RESIDUOS DE DISPARO

Debido al profuso uso de las armas de fuego en la actividad criminal, los organismos legales de investigación criminal han buscado una técnica efectiva para determinar cuando un individuo solamente ha manipulado o cuando ha disparado recientemente un arma de fuego. El valor de los exámenes de este tipo es primordial en las investigaciones de suicidios, homicidios, asaltos a mano armada y otras violaciones que involucran el uso de armas de fuego.

2.1.1 Pruebas de coloración

Los primeros intentos de detectar los residuos provenientes de la descarga de un arma de fuego se hicieron en 1933 por Teodoro González del Laboratorio de Policía de la ciudad de México, quien desarrolló el método conocido como “*Prueba de parafina*” o “*prueba dérmica de nitratos – Guantelete*”, técnica que buscaba establecer la presencia de nitratos en residuos de pólvora parcialmente quemada depositados en la mano del tirador durante la acción de disparar. El dorso de la mano del sospechoso de haber disparado se cubre con parafina derretida que al enfriarse se solidifica como un molde que posteriormente se retira (Figura 3). La superficie se rocía con una solución de N,N'-difenil-bencidina —posteriormente se empleó difenilamina— en ácido sulfúrico concentrado, a cuyo contacto desarrolla puntos azules oscuros que se consideran indicativos de la presencia de compuestos nitrados provenientes de la pólvora quemada y sin quemar⁹.

A pesar de lo equívoco de los resultados, la simplicidad de la prueba generó rápida aceptación. El FBI en 1935 reportó que la prueba no era específica y recomendó precaución en su uso, posteriormente fueron acumulados más datos que tendían a demostrar que numerosos materiales (por ejemplo, oxidantes, fertilizantes, algunos productos farmacéuticos, removedor de esmalte de uñas, orina) dieron falsos positivos como residuos de pólvora, con este reactivo. Como consecuencia de estos estudios, la Suprema Corte de Colorado, en 1959 declaró que los resultados de esta prueba no eran admisibles como evidencia y similares decisiones fueron adoptadas por algunas otras cortes de apelaciones.

Figura 3 Moldes de parafina para la prueba dérmica de nitratos (*Guantelete*).



Fuente: *Laboratorio de análisis traza de la Fiscalía General de la Nación (anteriormente laboratorio forense DAS).*

La prueba de coloración de Harrison-Gilroy fue ideada para identificar residuos de la descarga de armas de fuego basándose en la aparición de puntos coloreados en las manos del tirador provocados por minúsculas partículas de plomo, bario y antimonio —éstos dos últimos elementos no abundan en la naturaleza ni en los productos manufacturados—. Ésta prueba consiste en frotar las manos del sospechoso con hisopos impregnados con una solución de ácido clorhídrico diluido para remover todos los residuos de pólvora. Los hisopos se secan y se tratan con yoduro de trifenilmetilarsonio alcohólico, luego son secados nuevamente y posteriormente se adiciona una solución acuosa recientemente preparada de rodizonato de sodio. El primer reactivo, después de dos minutos, produce una coloración naranja si el antimonio se encuentra presente. El segundo reactivo produce puntos de color rojo con el bario, el plomo o la combinación de ambos, una subsecuente adición de ácido clorhídrico diluido (1:20) hace que los puntos rojos se tornen azules debido a la presencia de plomo o que se tornen de un rojo más intenso si se trata de bario¹⁰.

A pesar de la simplicidad de esta prueba, su fácil aplicación como prueba de campo y sus resultados confiables (baja incidencia de falsos positivos), no es lo suficiente sensible para detectar bajas concentraciones de estos elementos lo que, hoy por hoy, ha restringido su uso en los procesos investigativos y se limite su uso al análisis del tamaño y

densidad de los patrones de los residuos de nitritos sobre las prendas de vestir de las víctimas para establecer la distancia de disparo¹¹.

2.1.2 Pruebas instrumentales

En 1962 Ruch y colaboradores¹² presentaron el uso del análisis por activación neutrónica (NAA) como método sensible y específico para el análisis de bario y antimonio en residuos de disparo. Esta técnica consiste en colocar la muestra junto a una fuente de neutrones, usualmente un reactor nuclear, durante un periodo específico de tiempo. Ciertos elementos químicos de la muestra pueden absorber neutrones volviéndose radiactivos y otros no. La muestra se coloca luego en un sistema contador, que detecta y graba el total de la radiación emitida. Mediante la medición de la intensidad de emisión pueden determinarse las partículas de ese elemento en la muestra. NAA produce tanto un análisis cualitativo como cuantitativo, posee muy alta sensibilidad por lo que es fácil detectar bario, antimonio y cobre aún en partes por billón o menos.

Como principales desventajas de esta técnica se encuentran que no es aplicable al plomo y debe realizarse por personal especializado en usar un reactor nuclear como fuente de neutrones, lo que limita su uso a pocos laboratorios forenses que tienen esta capacidad.

En 1971 se reporta el uso de la espectroscopía de absorción atómica (AAS) con llama, técnica que aunque era lo suficientemente sensible para determinar los niveles de plomo presentes en la muestra no lo era para el caso del Ba y Sb, sólo hasta el desarrollo de los atomizadores electrotérmicos, la modalidad de horno de grafito hizo más llamativa esta técnica para los investigadores.

La microscopía electrónica de barrido (SEM) consiste en un microscopio que utiliza un haz de electrones en lugar de luz visible para visualizar el objeto. SEM tiene una profundidad de campo 200 veces mayor que un microscopio óptico, una resolución extremadamente alta y una capacidad de ampliación de 100.000X. Además, cuando el haz de electrones impacta la muestra, estos le transmiten parte de su energía ocasionando que electrones de la muestra le sean desprendidos emitiendo rayos X; la longitud de onda

de emisión es particular a cada elemento. Un microscopio electrónico de barrido, equipado con un analizador de rayos X (SEM/EDX) es una poderosa herramienta que proporciona información morfológica y de la composición elemental de las partículas individuales de una manera no destructiva y permitiendo la máxima especificidad en la detección de residuos de disparo¹³.

Varias técnicas adicionales han sido propuestas desde entonces para una rápida detección de residuos de disparo, entre ellas; fotoluminiscencia, ASV, DPASV, PIXE, ICP-MS y la microfluorescencia de rayos X que permitió el análisis de residuos de disparo sobre tejido humano y prendas de vestir, confirmando la posibilidad de un orificio de entrada de un proyectil y aportando información acerca de la distancia de disparo.

Actualmente las técnicas que gozan de mayor aceptación y proporcionan una mayor especificidad son ICP-MS y SEM/EDX. La primera técnica permite la identificación y cuantificación de los metales traza de interés en forma simultánea y con muy bajos límites de detección. La segunda permite observar tanto las características morfológicas de las partículas como su composición elemental.

Meng y Caddy en 1997 sugirieron que una vía para mejorar la especificidad de los análisis era estudiar simultáneamente los residuos orgánicos y los inorgánicos¹⁴. Con base en lo anterior, Bernal Morales y Revilla Vásquez desarrollaron una metodología para la detección simultánea de residuos orgánicos e inorgánicos de disparo por CE-UV con arreglo de diodos logrando la separación de 20 compuestos en 33 minutos. Aunque estadísticamente no encontraron diferencias entre los resultados obtenidos para la cuantificación de plomo entre CE y ASS electrotérmica, los límites de detección alcanzados con su metodología no fueron los necesarios para la detección e identificación de bario y antimonio¹⁵.

Independientemente al estudio de trazas de metales provenientes de residuos de disparo Hu y colaboradores desarrollaron una metodología en la que determinaban simultáneamente Pb, Cd y Hg en agua potable por HPLC en fase reversa, previa derivatización de los analitos con tetra-(4-bromofenil)-porfirina alcanzando límites de detección del orden de 0,5 ng/l para el plomo¹⁶. También Kaur y su equipo emplearon 2-

tiofenaldehído-3-tiosemicarbazona para la complejación y extracción de metales para su posterior detección y separación por HPLC¹⁷. Los límites de detección alcanzados con los procedimientos anteriores llaman poderosamente la atención en cuanto a la viabilidad de su aplicación para el análisis de residuos inorgánicos de disparo.

Varios autores han reportado resultados satisfactorios tanto con el uso de cromatografía de gases^{18,19,20,21} como de cromatografía líquida^{16,17,22,23} para el análisis de los compuestos orgánicos presentes en los residuos de disparo.

2.2 CONSIDERACIONES SOBRE LA ESPECIFICIDAD DEL ANÁLISIS DE RESIDUOS DE DISPARO

Los elementos presentes en la composición de un residuo de disparo (Pb, Ba, Sb) se encuentran en la naturaleza en muchas formas y combinaciones y son empleados mundialmente en numerosas aplicaciones comerciales e industriales. No obstante, la combinación de estos tres elementos en los compuestos estirato de plomo, nitrato de bario y sulfuro de antimonio sólo se encuentra en un producto con una aplicación particular: la mezcla del fulminante de un cartucho. La posibilidad de que podrían existir otras fuentes de partículas similares a las producidas por los residuos de disparo es muy importante, ya que si se llegara a comprobar que otra actividad o proceso podría producir partículas indistinguibles a los de residuos de disparo tanto en su morfología y/o composición, entonces el peso de los análisis para ser utilizados como prueba forense se reduciría considerablemente.

El análisis de residuos de disparo con técnicas de análisis tales como NAA, AAS, ICP-MS y EC no tiene en cuenta la morfología de las partículas individuales que se analizan y por lo tanto la posibilidad de obtener resultados falsos positivos es mucho mayor. Los tres elementos más comúnmente analizados utilizando estas técnicas son Pb, Ba, y Sb pueden hallarse en gran número de fuentes ambientales. El Pb se puede encontrar en las emisiones de gasolina con plomo, materiales de plomería, placas de baterías, soldadura, vidrio y pinturas. El Sb hace parte de varias aleaciones, a menudo con Pb en pirotecnia y sus óxidos se utilizan como retardantes de fuego en fibras de algodón y poliéster. El Ba

está presente en pinturas, grasa de automóvil, antioxidante en aleaciones de estaño, cobre, plomo y cinc, radiografía, tintas y colorantes, productos químicos fotográficos, insecticidas, pirotecnia y el sulfato de bario en productos de papel⁶.

Si el propósito de analizar los compuestos orgánicos es mejorar el valor probatorio de los análisis de los elementos metálicos presentes en los residuos de disparo, se debe determinar en qué medida estos compuestos de interés podrían provenir de otras fuentes. Se ha reportado que la difenilamina (DFA), compuesto estabilizador, puede encontrarse también en una variedad de fuentes ambientales como: la cáscara de las manzanas, llantas, prendas de vestir, combustibles sólidos de cohetes, pesticidas, colorantes, productos farmacéuticos y medicamentos veterinarios⁵.

3. METODOLOGÍA

3.1 ANÁLISIS DE RESIDUOS ORGÁNICOS DE DISPARO POR GC/MS

En este trabajo se determinó la composición de los residuos orgánicos de disparo producidos por revólveres y pistolas con munición Indumil. En una primera etapa se optimizaron las condiciones cromatográficas del método con el fin de detectar los compuestos orgánicos presentes en las pólvoras de la munición y maximizar su recuperación. Posteriormente se validó el método cromatográfico previamente optimizado y finalmente se aplicó el método a muestras reales.

3.1.1 *Instrumental*

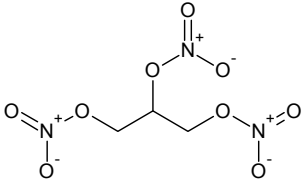
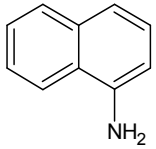
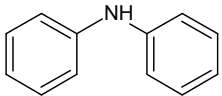
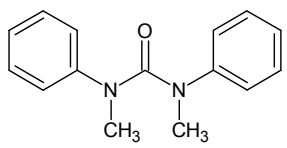
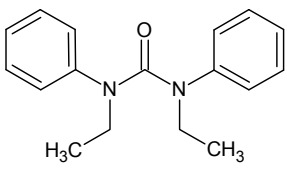
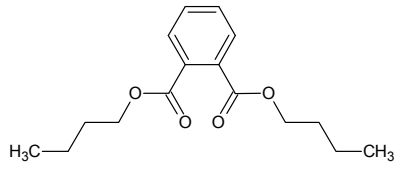
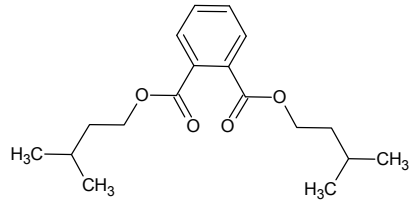
Los análisis fueron realizados en un cromatógrafo de gases con detector selectivo de masas marca Shimadzu modelo QP2010 Plus. Para la separación cromatográfica se empleó una columna capilar DB 1/MS de 30 m de longitud, diámetro interno de 0,25 mm y espesor de película de 0,50 μm . Las inyecciones fueron realizadas empleando un automuestreador marca Shimadzu AOC-20i.

Para la detección, los iones fueron formados por impacto electrónico (EI), las masas fueron analizadas por un cuadrupolo en el rango de 25 uma a 400 uma a una velocidad de 0,20 barridos por segundo en modo de adquisición de barrido de iones (SCAN), modo de adquisición de monitoreo de ion seleccionado (SIM) y modo de adquisición SCAN/SIM automatizado (FASST).

3.1.2 *Sustancias de referencia*

Los compuestos presentes en las muestras de pólvora y en los residuos de disparo analizados en éste trabajo se listan en la Tabla 1.

Tabla 1 Listado de sustancias analizadas por GC/MS.

Nombre	Fórmula química	Ion m/z objetivo (uma)	Estructura
1 Nitroglicerina (NG) (Biosano Lab. Solución 5.000 mg/L)	$C_3H_5N_3O_9$	46	
2 Naftilamina (NA) (Supelco)	$C_{10}H_9N$	143	
3 Difenilamina (DFA) (Merck)	$C_{12}H_{11}N$	169	
4 Metilcentralita (MC) (*)	$C_{15}H_{16}N_2O$	134	
5 Etilcentralita (EC) (Aldrich)	$C_{17}H_{20}N_2O$	120	
6 Ftalato de dibutilo (DBFT) (Sigma-Aldrich)	$C_{16}H_{22}O_4$	149	
7 Ftalato de diisopentilo (DIPFT) (*)	$C_{18}H_{26}O_4$	149	

(*) Compuestos obtenidos de la pólvora de la munición .357 Magnum Hirtenberger Patronen.

Las soluciones de las sustancias de referencia se conservaron refrigeradas a una temperatura de 4 °C, en recipientes de vidrio ámbar para evitar la acción de la luz.

3.1.3 Solventes

Acetona, etanol, isopropanol (IPA) y cloroformo grado reactivo Merck.

3.1.4 Gases empleados

Helio 99.999% de pureza.

3.1.5 Selección del solvente de extracción

Inicialmente se evaluó que solvente ofrecía la mejor extracción, para ello se pesó 1 mg de la pólvora del cartucho de munición 9 mm Indumil y se realizó la combustión, luego se adicionó 1 mL de solvente (acetona, isopropanol, etanol ó cloroformo) y se realizó extracción ultrasónica con solvente (USE) durante 10 minutos.

3.1.6 Optimización de parámetros cromatográficos

La optimización de la separación y determinación de seis componentes de las pólvoras sin humo y del estándar interno, mencionados en la Tabla 1 se llevó a cabo en dos etapas, la primera de diagnóstico mediante el análisis multivariable haciendo uso del diseño factorial fraccionado Plackett-Burman en el que se analizaron los efectos principales de los siete factores mencionados en la Tabla 2, cada uno de los cuales se evaluó a dos niveles.

Tabla 2 Factores considerados para el diseño experimental de siete factores y dos niveles.

Factores		Unidades	Nivel bajo (1)	Nivel alto (2)
X1	Temperatura de la interfase	°C	170	250
X2	Temperatura del inyector	°C	170	280
X3	Presión de columna*	KPa	40	80
X4	Temperatura de la fuente de iones	°C	170	250
X5	Flujo	mL/min	0,8	1
X6	Tiempo de muestreo**	min	0,5	1
X7	Tiempo de presurizado***	min	0,5	1

* Presión adicional en el modo de inyección de alta presión.

** Tiempo de duración de la supresión de la división de flujo *splittless*.

*** Tiempo de duración del modo de inyección de alta presión.

Con este experimento preliminar, compuesto por 12 observaciones (ver Tabla 3), se buscó identificar cualesquiera de los efectos principales que fueran importantes para el proceso cromatográfico, además de intentar reducir el número de unidades experimentales y el tiempo necesario para esta primera etapa de optimización. El área del pico cromatográfico de cada compuesto se usó como variable de respuesta y los resultados fueron procesados con el software estadístico JMP versión 10.0.0.

Tabla 3 Matriz de experimentos de siete factores y dos niveles.

Observación	Factores						
	X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7
1	1	-1	-1	1	-1	1	1
2	1	1	-1	-1	1	-1	1
3	1	1	1	-1	-1	1	-1
4	-1	1	1	1	-1	-1	1
5	1	-1	1	1	1	-1	-1
6	-1	1	-1	1	1	1	-1
7	-1	-1	1	-1	1	1	1
8	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1
9	-1	-1	1	-1	-1	1	-1
10	1	-1	1	-1	1	1	1
11	-1	1	-1	-1	1	-1	1
12	1	1	-1	-1	-1	-1	-1

Para la segunda etapa de la optimización se empleó la metodología de superficie de respuesta utilizando un diseño Doehlert para encontrar los valores de las condiciones cromatográficas que resultaron ser las más significativas durante la etapa previa de diagnóstico.

3.1.7 Validación de parámetros cromatográficos

3.1.7.1 Determinación de la calidad de la separación cromatográfica

Una vez establecidas las condiciones óptimas se seleccionaron diez corridas cromatográficas de la mezcla de patrones y con la ayuda del software del equipo (GCMSsolution versión 2.50 SU3) se estimaron los parámetros como el factor de coqueo (*tailing*) de los picos, la resolución, los factores de capacidad, número de platos teóricos y precisión de los tiempos de retención.

3.1.7.2 Confirmación de la identidad y la selectividad

Para confirmar la identidad de los analitos cuando se empleó el modo de adquisición SCAN se compararon los tiempos de retención y sus espectros de masas con los de los respectivos patrones y búsqueda en las espectrotescas disponibles (Wiley versión 8 y Nist Mass Spectral search program versión 2008). Cuando se trabajó en modo SIM, la identidad de los analitos se confirmó con la comparación con el tiempo de retención del respectivo patrón bajo condiciones de operación idénticas.

Para determinar las posibles interferencias, atribuibles a la matriz, se procedió a analizar bajo condiciones idénticas muestras procedentes del frotis de las manos de personas que no habían disparado armas de fuego.

3.1.7.3 Linealidad y exactitud

Para estimar conjuntamente estos parámetros se realizó un pseudo-programa de ensayos interlaboratorios, según lo recomendado por la norma NTC 3529-6 (ISO 5725-6), que consistió en preparar una serie de cinco puntos de las curvas de calibración en el rango de 0,1 mg/L a 1,0 mg/L para NG y 0,02 mg/l y 0,20 para DFA y EC. Cada punto de la curva de calibración se analizó por triplicado, siguiendo la metodología optimizada en modo SIM. Éste análisis se repitió en cinco días diferentes partiendo de soluciones recién preparadas.

La exactitud del método (precisión y veracidad) se determinó dopando hisopos de algodón de vástago de madera con cantidades variables de una solución de dopaje compuesta por una mezcla de NG (5500 mg/L), DFA (1010 mg/L) Y EC (980 mg/L).

Tabla 4 Cantidades empleadas para dopar los hisopos de algodón y concentración final obtenida al realizar la posterior extracción y ajuste de volumen a 2 mL para los cuatro niveles de concentración escogidos.

Nivel	Volumen de la solución de dopaje (μL)	Concentración final al enrasar a 2 mL (mg/L)		
		NG	DFA	EC
1	100	0,275	0,051	0,049
2	200	0,550	0,101	0,098
3	300	0,825	0,152	0,147
4	400	1,100	0,202	0,196

A cada hisopo se le adicionó la cantidad indicada en la Tabla 4 de la solución de dopaje. Para el caso de los hisopos que requerían de 300 μL y 400 μL de la solución de dopaje, primero se les agregó a cada uno 200 μL de la solución de dopaje y se permitió que el solvente se evaporara a temperatura ambiente durante 15 minutos, posteriormente se añadieron los 100 μL y 200 μL faltantes, respectivamente, de la solución de dopaje.

Después del dopaje se dejó evaporar el solvente durante media hora, transcurrido éste tiempo se realizaron dos extracciones sucesivas con 800 μL de acetona con ultrasonido durante 10 minutos, la solución resultante se llevó a un matraz aforado de 2 mL, seguidamente se adicionaron 400 μL de la solución de estándar interno de naftilamina 0,720 mg/L y se ajustó el volumen faltante con acetona.

Las soluciones resultantes correspondientes a los cuatro niveles de concentración se analizaron por triplicado junto con los puntos de la curva de calibración siguiendo la metodología optimizada en modo SIM.

3.1.7.4 Límites de detección y cuantificación (LD y LC)

Se analizaron soluciones de nitroglicerina, difenilamina y etilcentralita a niveles bajos de concentración conocida y mediante la aplicación de las metodologías de relación de señal-ruido y la desviación estándar de la respuesta, descritas en 10.4 del ANEXO IV se estimaron los límites de detección y cuantificación para estos tres compuestos.

3.1.8 Aplicación de la metodología a muestras reales

3.1.8.1 Ensayos sobre diferentes tipos de munición

La Tabla 5 enumera los diecinueve tipos de munición facilitados por el grupo de Balística del Laboratorio de Investigación Científica de la Fiscalía General de la Nación y cuyas características se encuentran descritas más detalladamente en el ANEXO I.

Tabla 5 Tipos de munición estudiada.

Tipo de munición		Tipo de munición	
M1	9 mm Águila	M11	.380 Auto Águila – Cartuchos deportivos de México
M2	9 mm Indumil nato	M12	.380 Auto Lapuan Patruunatehdas
M3	38 largo Indumil	M13	.380 Auto Sellier & Bellot
M4	32 largo Indumil	M14	.380 Recalzado
M5	.22 Remington	M15	9 mm Recalzado
M6	7.65 Indumil	M16	.38 corto Remington Arms
M7	7.65 Remington	M17	9 mm Bermington Arms Company
M8	.25 Auto Sellier & Bellot	M18	.32 Largo Winchester-Western
M9	.25 Auto Olin Corp. Win	M19	.357 Magnum Hirtenberger Patronen
M10	.32 corto Companhia Brasileira de cartuchos		

Para el análisis cromatográfico en un vial de 2 mL se pesó 1,00 mg de la pólvora extraída de los cartuchos, se adicionaron 1000 μ L de acetona y se colocó en ultrasonido por diez minutos hasta la dilución completa de las partículas de pólvora.

3.1.8.2 Realización de los disparos

Previo a la ejecución de los disparos se tuvieron en cuenta las siguientes disposiciones:

- Las manos de quien ejecutaba el disparo debían encontrarse libres de cualquier tipo de joya o accesorio (anillos, pulseras y relojes).
- Ambas manos debían lavarse minuciosamente antes de realizar el disparo evitando el contacto con cualquier tipo de superficie hasta la realización del disparo.
- Las armas de fuego empleadas (ver Tabla 6) fueron limpiadas exhaustivamente, evitando el uso de detergentes, entre cada disparo efectuado por personal del grupo de balística, del LABICI Cali.
- La entrada al cuarto de disparos, se permitió únicamente cuando fuera el turno de disparar.
- Una vez realizado el disparo el voluntario entregaba el arma y salía del cuarto de disparos.

Tabla 6 Armas de fuego empleadas en este estudio.

Código	Tipo	Marca	Modelo	Calibre
F1	Fusil	Galil	AR	5.56 x 45 mm
R1	Revólver	Llama	Scorpion	38L
R2	Revólver	Llama	Cassydy	38L
R3	Revólver	Smith & Wesson	1012	38L
R4	Revólver	Taurus	RT 82	.38 SPL
P1	Pistola	Jericho	92FS	9 mm
P2	Pistola	Beretta	Cougart	9 mm
P3	Pistola	Sigsaber	SP2022	9 mm
P4	Pistola	Browning	BDA-380	9 mm
P5	Pistola	Smith & Wesson	39-2	9 mm

3.1.8.3 Toma de muestra

Se utilizaron hisopos de algodón con vástago de madera impregnados con solvente (ver 4.1.1) para efectuar una limpieza profunda (frotis) aplicando una presión moderadamente fuerte sobre la parte del cuerpo correspondiente (se tomaron 4 muestras por individuo: 2 correspondientes a las palmas y 2 a los dorsos de cada mano, Figura 4); la toma de la muestra se hizo unidireccionalmente hacia el extremo distal de la palma o dorso de la mano, teniendo en cuenta que se tiene que cubrir toda la superficie y manipular lo menos posible las manos del individuo para evitar contaminaciones o desprendimientos de los residuos de disparo. Para la toma de muestra se emplearon guantes de látex nuevos para realizar el muestreo entre cada individuo¹⁵. Adicionalmente un hisopo se humedeció con acetona y se utilizó como control negativo.

Figura 4 Zonas de muestreo para residuos de disparo. A) Dorso. B) Palma de la mano.



Fuente: Bernal, E. y Revilla, A. L. J. *Chromatogr. A*, 1061 (2004) 225-233¹⁵

Una vez colectada la muestra se colocó en un tubo de ensayo de vidrio de 10 mL el cual se rotuló y se selló con papel aluminio.

3.1.8.4 Conservación de las muestras

Para conservar la integridad físico-química de las muestras, en caso de que éstas no se analizaran inmediatamente después del muestreo, se guardaron en el refrigerador a 4 °C hasta el momento de su procesamiento.

3.1.8.5 Extracción y análisis

Se cortó el vástago de madera de cada hisopo lo más cerca posible del algodón, usando tijeras de acero inoxidable. El extremo con algodón se depositó nuevamente sobre el tubo de ensayo al que se agregaron 500 µL de acetona y se agitó durante 10 minutos en baño ultrasonido, el sobrenadante se transfirió a un vial para automuestreador. Se adicionaron otros 500 µL de acetona al tubo de ensayo y se repitió la extracción ultrasónica por otros 10 minutos, transcurrido éste tiempo el sobrenadante se reunió con el anterior extracto en el vial para automuestreador y se analizó cromatográficamente con el método desarrollado y validado.

3.2 ANÁLISIS DE RESIDUOS INORGÁNICOS DE DISPARO POR MEKC-UV

El propósito de este trabajo es desarrollar un método de MEKC para analizar los residuos inorgánicos (Pb, Ba y Sb) producidos por armas de fuego como una alternativa más rápida y económica que las técnicas que se utilizan actualmente por los laboratorios forenses nacionales.

3.2.1 Sustancias de referencia

Se contó con patrones para plomo, bario y antimonio de 1000 mg/L de concentración (Merck).

3.2.2 Reactivos

- Ácido diaminociclohexanotetraacético, CDTA (Fluka) para preparar los complejos metálicos.
- Dodecilsulfato de sodio, SDS (Merck) como surfactante.
- Tetraborato de sodio, ácido bórico, ácido acético, ácido clorhídrico.
- Agua destilada y deionizada.

3.2.3 Instrumental

Se utilizó un sistema de electroforesis capilar Applied Biosystems (Foster City, CA) model 270A-HT equipado con detector ultravioleta, un módulo de inyección para vacío y electromigración y una fuente de voltaje que opera entre 0 KV y ± 30 KV. Acoplado por medio de una interfase modelo 35900C Hewlett-Packard (Palo Alto, CA) para la adquisición de datos. El análisis de datos se efectuó con el software ChemStation de Hewlett-Packard. Se usó un capilar de sílica fundida recubierto con película de poliimida (Tecnologías de la Polymicro, Arizona, EE.UU.) con una longitud total de 100 cm (78 cm de longitud al detector) y diámetro interno de 75 μ m.

Los capilares nuevos se acondicionaron, siguiendo la metodología propuesta por Gómez y Sandoval²⁴, en modo “dinámico” forzando, mediante la aplicación de una presión de nitrógeno de 80 psi, la circulación de una solución de NaOH 1 M a través del capilar durante una hora. Después se enjuagó el capilar con agua desionizada durante el mismo periodo de tiempo y finalmente con tampón electroforético durante otra hora. Al principio de cada día de trabajo, el capilar se pre-acondicionaba durante 10 minutos con agua desionizada y 10 minutos con tampón electroforético. No se realizó acondicionamiento entre corridas.

La ventana de detección en el capilar se elaboró removiendo aproximadamente uno o dos centímetros de la capa de poliimida a una distancia de 12 cm de uno de los extremos del

capilar mediante un procedimiento de leve raspado con el extremo filoso de un bisturí y posterior remoción de los residuos de poliimida con un trozo de tela suave humedecido con isopropanol.

La inyección de las muestras se hizo hidrodinámicamente. La temperatura del capilar fue de 30°C.

El tampón electroforético seleccionado consistía en una disolución acuosa 20 mM de tetraborato sódico con 16 mM de SDS y 0,5 mM de CDTA, ajustado a pH 9,2 con ácido clorhídrico.

3.2.4 Procedimientos

3.2.4.1 Procedimiento de preconcentración

El mayor inconveniente al usar detección UV-Vis en MEKC es el pequeño paso de luz (diámetro del capilar 75µm) y el bajo volumen de muestra introducido, por lo que se reduce de forma notable la sensibilidad. Este problema de sensibilidad puede ser resuelto mediante el empleo de técnicas de preconcentración, tanto “off-line” como “on-line”.

La técnica de preconcentración empleada para aumentar la sensibilidad del método optimizado fue la técnica de preconcentración “on-line” por acumulación o *stacking*, que consiste en la inyección hidrodinámica de una gran cantidad de muestra con una conductividad eléctrica menor que la de la disolución de separación. Luego se aplica un voltaje de polaridad negativa (-30KV) cuando los viales de entrada y salida contienen la disolución de separación, en este modo de trabajo la focalización ocurre en la interfaz entre la matriz de baja conductividad y la disolución de separación de mayor conductividad, debido al cambio brusco del campo eléctrico local y como consecuencia, en la movilidad electroforética de los analitos. Finalmente, se cambia la polaridad a positiva sólo cuando la corriente haya alcanzado entre un 97% y 99% de la corriente inicial antes de aplicar la polaridad negativa²⁵.

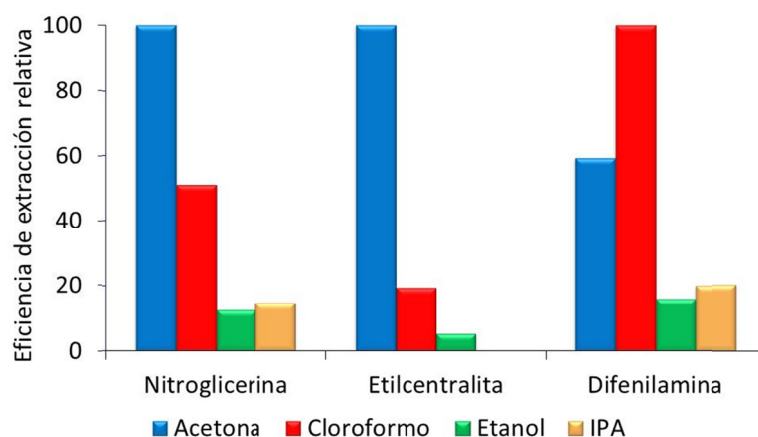
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 ANÁLISIS DE RESIDUOS ORGÁNICOS DE DISPARO POR GC/MS

GC/MS no ha sido muy empleada para el análisis de residuos orgánicos de disparo pues, al parecer, no tiene la sensibilidad requerida. La bibliografía revisada no indica que las metodologías empleadas hayan sido optimizadas y no se hace referencia al uso de inyección de alta presión (equipos Shimadzu) o inyección pulsada (equipos Agilent) ^{5,26,27} correspondiente a una modalidad de inyección que permite el paso de la muestra más rápidamente a la columna minimizando la posibilidad de descomposición de los analitos en el liner del inyector. En éste trabajo se hace uso de la optimización multivariable para encontrar las condiciones instrumentales óptimas para superar la limitante de la insuficiente sensibilidad de esta técnica analítica.

4.1.1 Selección del solvente de extracción

En la Figura 5 se observa la marcada diferencia de la eficiencia de extracción de la acetona para la nitroglicerina y etilcentralita comparada con los otros solventes. También se observa que el cloroformo es el solvente que presenta una mejor eficiencia de extracción para la difenilamina mientras que el etanol y el acohol isopropílico presentan los valores más bajos de eficiencia de extracción. Por consiguiente, se selecciona a la acetona como el solvente para la preparación de las soluciones de trabajo, para impregnar los hisopos de algodón con que se realiza el frotis sobre las manos de quienes realizaron disparos y para la realizar extracción con ultrasonido.

Figura 5 Efecto del solvente empleado sobre la eficiencia de la extracción.

4.1.2 Optimización de parámetros cromatográficos

Para la optimización del método analítico no se siguió el modo tradicional univariante, pues encontrar las mejores condiciones se convertiría en una tarea larga, tediosa y costosa, teniendo en cuenta que cada corrida cromatográfica requería más de cuarenta minutos. Afortunadamente, la aplicación de la quimiometría permitió diseñar y/o seleccionar experimentos que proporcionaron el máximo de información química relevante mediante una metodología multivariante²⁸.

Se realizó la experimentación en dos etapas: una etapa de *diagnóstico* (o diseño de “*screening*”), que tenía como objetivo establecer entre un gran número de variables (factores) cuáles afectaban significativamente a la respuesta. Y una segunda etapa de *optimización*, en la que se busca conocer el valor de los factores que proporcionan la mejor respuesta posible, evaluando la superficie de respuesta.

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 7. Todos aquellos factores cuyo valor de probabilidad (p -value $\text{Prob}>|t|$) resultó ser inferior a 0,1 se consideran variables significativas, por lo que afectan considerablemente la variable de respuesta²⁹.

Tabla 7 Efectos estimados para cada uno de los factores que afectan el área del pico cromatográfico.

	NG		NA		DFA		MC	
	Estimado	Prob> t	Estimado	Prob> t	Estimado	Prob> t	Estimado	Prob> t
Temperatura Inyector	-533.266	0,08	100.974	0,43	2.599.947	0,02	21.805	0,03
Tiempo de muestreo	301.080	0,26	436.562	0,02	771.794	0,34	13.121	0,11
Tiempo de presurizado	234.655	0,35	255.721	0,08	346.718	0,65	6.796	0,34
Temperatura interfase	159.440	0,49	114.862	0,34	-120.252	0,86	3.592	0,57
Temperatura fuente	-140.570	0,56	-216.831	0,13	-167.446	0,82	7.088	0,32
Presión columna	100.537	0,68	502.111	0,01	560.298	0,48	10.277	0,19
Flujo	34.112	0,88	-145.782	0,26	-51.692	0,94	-3.457	0,61
r^2	0,79		0,94		0,77		0,81	

	EC		DBFT		DIPFT	
	Estimado	Prob> t	Estimado	Prob> t	Estimado	Prob> t
Temperatura Inyector	46.485	0,02	77.394	0,01	82.339	0,01
Tiempo de muestreo	31.748	0,05	2.093	0,92	1.807	0,93
Tiempo de presurizado	9.335	0,45	34.240	0,14	37.106	0,12
Temperatura interfase	4.532	0,69	12.140	0,52	13.030	0,51
Temperatura fuente	20.391	0,14	-6.631	0,74	-6.117	0,76
Presión columna	20.799	0,14	38.213	0,11	41.515	0,10
Flujo	-8.457	0,49	-34.101	0,14	-37.248	0,12
r^2	0,87		0,86		0,86	

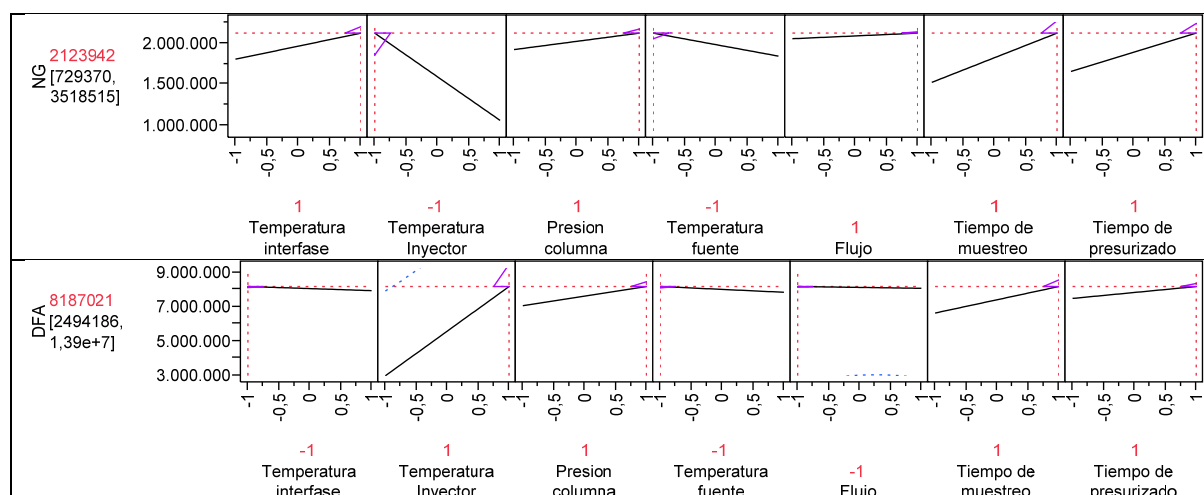
El factor temperatura del inyector para todos los compuestos, excepto naftilamina, presentó valores de probabilidad inferiores a 0,1, lo que denota su fuerte influencia sobre la respuesta del detector y que debe ser un factor a tenerse en cuenta en la optimización del método cromatográfico. De la Tabla 7 se puede destacar que el valor estimado de la temperatura del inyector para la nitroglicerina tiene valor negativo, lo que indica que al aumentar la temperatura se disminuye la respuesta del detector, caso contrario para los demás componentes de las pólvoras sin humo. Otros factores que también muestran ser significativos son tiempo de presurizado y presión de la columna para la naftilamina, tiempo de muestreo para la difenilamina y presión de la columna para el ftalato de isopentilo.

En la Tabla 7 se indican los valores de r^2 que oscilaron entre 0,79 y 0,94, para este tipo de estudios de diagnóstico se consideran aceptables²⁹.

Las gráficas de perfiles mostradas en la Figura 6 corresponden a la respuesta pronosticada por el modelo cuando un factor es modificado mientras que los restantes permanecen constantes. Estas gráficas son especialmente útiles cuando se tienen múltiples factores y se requiere establecer cuál valor ofrece los mejores resultados de un conjunto de criterios complejo.

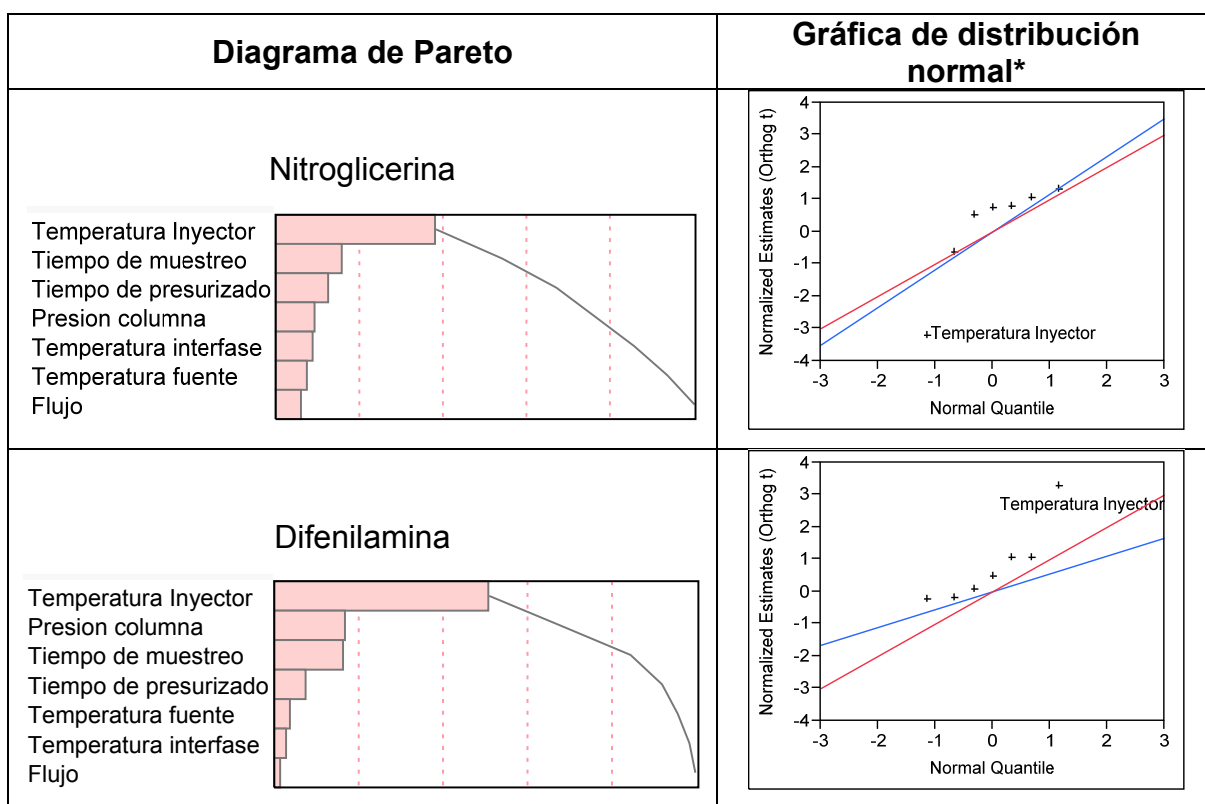
Las gráficas anteriores representan la variación de la respuesta con respecto a cada factor, siendo aquellas que presentan una línea con pendiente mayor, las correspondientes al factor con mayor influencia. Así pues, para la nitroglicerina puede apreciarse que el tiempo de muestreo, el tiempo de presurizado y temperatura del inyector son los que presentan una mayor influencia en la respuesta, mientras que el flujo en el rango estudiado (0,8 mL/min a 1,0 mL/min) no parece afectar significativamente. También puede apreciarse que para la nitroglicerina un aumento de la temperatura conduce a una disminución en la respuesta que es la situación contraria para la difenilamina y los compuestos restantes (ver ANEXO II)

Figura 6 Gráficas de perfiles para la nitroglicerina y la difenilamina del diseño factorial de dos niveles con siete factores y como respuesta el área del pico cromatográfico.



Otra forma de examinar el efecto de cada factor es mediante el análisis del diagrama de Pareto y de la gráfica de distribución normal de cada compuesto (Figura 7). El diagrama de Pareto muestra los valores absolutos de los estimados ortogonalizados mostrando su composición relativa a la suma de los valores absolutos. Por defecto, los estimados son ortogonalizados para ser no correlacionados y estandarizados para tener variancias iguales. En éste diagrama se muestra una serie de barras ordenadas de mayor a menor tamaño que representan las contribuciones de cada factor. Nuevamente, se observa que para la mayoría de los compuestos la temperatura del inyector es el factor más influyente sobre la respuesta (área del pico cromatográfico).

Figura 7 Diagramas de Pareto y gráficas de distribución normal producidad por el diseño factorial de dos niveles con siete factores y como respuesta el área del pico cromatográfico.



* La línea roja en la gráfica de distribución normal corresponde a una línea con pendiente igual a 1.

Los gráficos para los compuestos restantes se encuentran en el ANEXO III.

En la gráfica de distribución normal los estimados se ubican en el eje vertical, mientras que los cuantiles normalizados sobre el eje de horizontal, si todos los efectos se deben a ruido aleatorio, ellos tienden a ubicarse sobre la línea recta (de color azul) con pendiente σ , error estándar. Éste tipo de gráfico ayuda a identificar efectos que se desvían de la distribución normal, el programa estadístico los identifica y los etiqueta. Las gráficas de distribución normal en la Figura 7 corroboran la fuerte influencia de la temperatura del inyector al alejarse de la distribución normal.

Esta primera etapa de diagnóstico hace uso de la información suministrada por la Tabla 7, la Figura 6 y la Figura 7 para identificar qué factores afectan substancialmente la respuesta.

Se puede concluir que para la nitroglicerina el factor con mayor aporte es la temperatura del inyector, hecho que evidencia la termolabilidad de este compuesto. Para los demás componentes de las pólvoras sin humo se presentó la situación contraria, siendo el nivel 1 de temperatura del inyector el que arrojó mejores respuestas. Para la naftilamina, estándar interno, la presión de columna, el tiempo de muestreo y el tiempo de presurizado fueron los factores de mayor aporte a la respuesta de este compuesto.

Factores como el flujo, temperatura de la interfase y temperatura de la fuente de ionización presentaron, en el rango de los niveles estudiados, contribuciones poco significativas a las respuestas de los compuestos.

Con la información de la etapa anterior de diagnóstico es posible reducir el número de factores de los siete iniciales a cuatro: temperatura del inyector, tiempo de muestreo, presión de columna y tiempo de presurizado, y construir un experimento de optimización compuesto por 21 observaciones siguiendo la metodología de superficies de respuesta con un diseño Doehlert.

Tabla 8 Matriz de experimentos diseño Doehlert.

Obs	Factores *				Respuestas (Área)						
	X1	X2	X3	X4	NG	NA	DFA	MC	EC	DBFT	DIPFT
1	1	0	0	0	$6,7 \times 10^6$	$7,2 \times 10^6$	$1,8 \times 10^7$	$5,2 \times 10^5$	$5,9 \times 10^5$	$8,8 \times 10^5$	$7,9 \times 10^5$
2	-1	0	0	0	$9,6 \times 10^6$	$5,6 \times 10^6$	$1,5 \times 10^7$	$6,9 \times 10^4$	$8,1 \times 10^4$	$1,2 \times 10^2$	$1,1 \times 10^2$
3	0,5	0,87	0	0	$1,0 \times 10^7$	$6,6 \times 10^6$	$1,8 \times 10^7$	$4,0 \times 10^5$	$4,4 \times 10^5$	$5,9 \times 10^5$	$5,0 \times 10^5$
4	-0,5	-0,87	0	0	$7,5 \times 10^6$	$4,4 \times 10^6$	$1,2 \times 10^7$	$9,8 \times 10^4$	$1,2 \times 10^5$	$5,4 \times 10^4$	$4,8 \times 10^4$
5	0,5	-0,87	0	0	$6,7 \times 10^6$	$4,1 \times 10^6$	$1,4 \times 10^7$	$2,5 \times 10^5$	$3,1 \times 10^5$	$4,4 \times 10^5$	$3,6 \times 10^5$
6	-0,5	0,87	0	0	$1,2 \times 10^7$	$4,9 \times 10^6$	$1,7 \times 10^7$	$1,4 \times 10^5$	$1,6 \times 10^5$	$6,7 \times 10^4$	$5,4 \times 10^4$
7	0,5	0,29	0,82	0	$1,0 \times 10^7$	$3,9 \times 10^6$	$1,7 \times 10^7$	$2,9 \times 10^5$	$3,3 \times 10^5$	$5,3 \times 10^5$	$4,3 \times 10^5$
8	-0,5	-0,29	-0,82	0	$5,2 \times 10^6$	$1,8 \times 10^6$	$8,7 \times 10^6$	$7,2 \times 10^4$	$7,9 \times 10^4$	$5,1 \times 10^4$	$4,5 \times 10^4$
9	0,5	-0,29	-0,82	0	$5,7 \times 10^6$	$2,1 \times 10^6$	$9,8 \times 10^6$	$1,9 \times 10^5$	$2,1 \times 10^5$	$4,1 \times 10^5$	$3,8 \times 10^5$
10	-0,5	0,29	0,82	0	$1,0 \times 10^7$	$3,6 \times 10^6$	$1,5 \times 10^7$	$1,2 \times 10^5$	$1,5 \times 10^5$	$7,6 \times 10^4$	$6,1 \times 10^4$
11	0	0,58	-0,82	0	$1,1 \times 10^7$	$3,5 \times 10^6$	$1,7 \times 10^7$	$2,4 \times 10^5$	$2,6 \times 10^5$	$2,6 \times 10^5$	$2,4 \times 10^5$
12	0	-0,58	0,82	0	$7,4 \times 10^6$	$2,4 \times 10^6$	$1,2 \times 10^7$	$1,5 \times 10^5$	$1,7 \times 10^5$	$1,9 \times 10^5$	$1,7 \times 10^5$
13	0,5	0,29	0,20	0,79	$1,0 \times 10^7$	$2,7 \times 10^6$	$1,7 \times 10^7$	$2,5 \times 10^5$	$3,1 \times 10^5$	$4,3 \times 10^5$	$3,6 \times 10^5$
14	-0,5	-0,29	-0,20	-0,79	$6,7 \times 10^6$	$1,8 \times 10^6$	$1,2 \times 10^7$	$9,1 \times 10^4$	$1,1 \times 10^5$	$7,0 \times 10^4$	$5,8 \times 10^4$
15	0,5	-0,29	-0,20	-0,79	$7,3 \times 10^6$	$1,9 \times 10^6$	$1,3 \times 10^7$	$1,9 \times 10^5$	$2,4 \times 10^5$	$3,9 \times 10^5$	$3,2 \times 10^5$
16	-0,5	0,29	0,20	0,79	$1,4 \times 10^7$	$1,2 \times 10^7$	$2,1 \times 10^7$	$3,2 \times 10^5$	$3,6 \times 10^5$	$8,0 \times 10^4$	$7,3 \times 10^4$
17	0	0,58	-0,20	-0,79	$6,6 \times 10^6$	$2,0 \times 10^6$	$1,1 \times 10^7$	$9,7 \times 10^4$	$1,2 \times 10^5$	$1,0 \times 10^5$	$9,0 \times 10^4$
18	0	-0,58	0,20	0,79	$7,7 \times 10^6$	$2,2 \times 10^6$	$1,2 \times 10^7$	$1,5 \times 10^5$	$1,6 \times 10^5$	$1,4 \times 10^5$	$1,2 \times 10^5$
19	0	0	0,61	-0,79	$5,8 \times 10^6$	$1,8 \times 10^6$	$9,8 \times 10^6$	$1,2 \times 10^5$	$1,3 \times 10^5$	$1,6 \times 10^5$	$1,3 \times 10^5$
20	0	0	-0,61	0,79	$5,3 \times 10^6$	$1,4 \times 10^6$	$9,0 \times 10^6$	$1,0 \times 10^5$	$1,1 \times 10^5$	$1,3 \times 10^5$	$1,1 \times 10^5$
21	0	0	0	0	$8,2 \times 10^6$	$2,4 \times 10^6$	$1,3 \times 10^7$	$1,3 \times 10^5$	$1,6 \times 10^5$	$1,5 \times 10^5$	$1,3 \times 10^5$

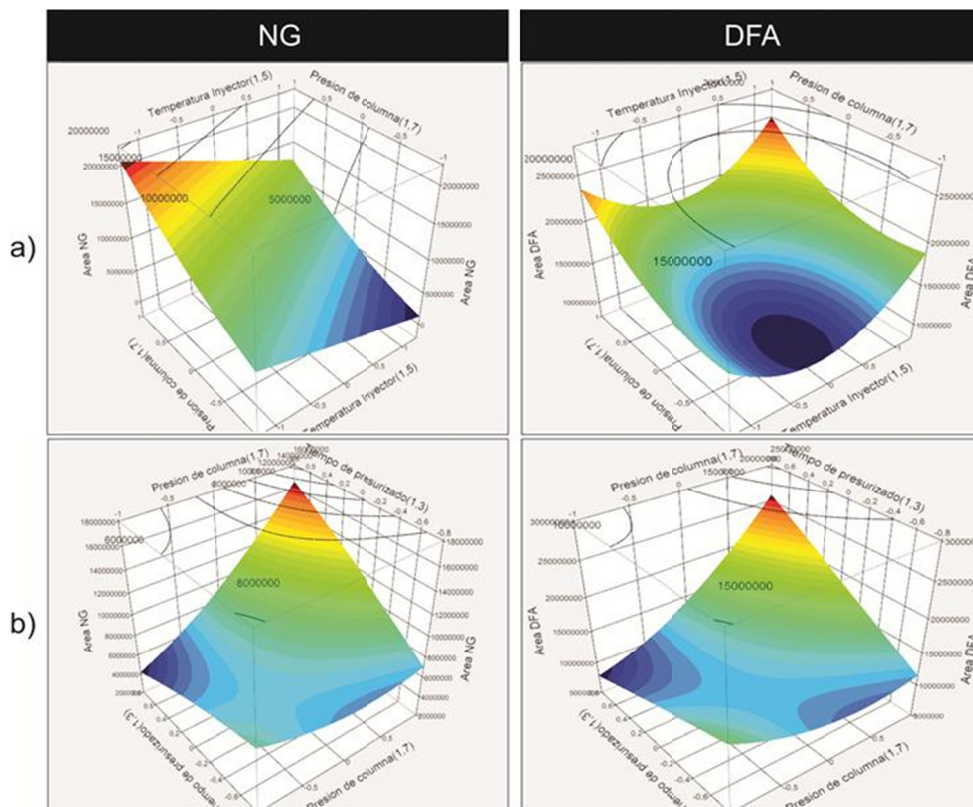
* Los valores de los niveles se encuentran codificados, y se calculan según lo indican la Ecuación 22 y la Ecuación 23 del anexo V.

Tabla 9 Factores considerados para el diseño experimental Doehlert de cuatro factores.

Factores		Unidades	Nivel bajo (-1)	Nivel alto (1)
X1	Temperatura del inyector	°C	150	280
X2	Presión de columna	KPa	40	80
X3	Tiempo de muestreo	min	0,5	1
X4	Tiempo de presurizado	min	0,5	1

Los valores de los factores cuya influencia se determinó que no era significativa en la etapa de diagnóstico se fijaron en 250 °C para la temperatura de la interfase y la temperatura de la fuente de iones, y de 1 mL/min para el flujo.

Figura 8 Gráficas de superficie 3D para la nitroglicerina y la difenilamina. a) temperatura del inyector – presión columna, b) presión columna – tiempo de presurizado.



La Figura 8 muestra los gráficos de superficie obtenidos del diseño Doehlert se puede observar nuevamente el efecto contrario que ejerce la temperatura del inyector en la nitroglicerina en comparación con los demás compuestos (en el ANEXO IV se encuentran las gráficas de superficie para los demás compuestos), lo que conduce a tomar la decisión de emplear para el análisis de los componentes de las pólvoras sin humo dos métodos cromatográficos diferentes, uno optimizado específicamente para la nitroglicerina y el otro para los componentes restantes. Los colores en las gráficas varían del azul al rojo siendo las tonalidades rojas las que indican valores mayores de respuesta, por consiguiente las condiciones óptimas estarán representadas por una tonalidad roja.

La Figura 8(a) muestra como, para la nitroglicerina, un incremento en la presión de columna afecta positivamente la respuesta, por lo que utilizar la mínima temperatura y la

mayor presión de columna ofrece los mejores resultados. Para la difenilamina y los demás compuestos los gráficos de superficie muestran un mínimo, sugiriendo que el rango estudiado no es el que proporciona las mejores respuestas.

Adicionalmente, las graficas de superficie de la Figura 8(b) indican que a mayores presiones de columna y tiempos de presurizado se obtienen mejores respuestas para todos los compuestos. Pero, al parecer, la selección del rango evaluado (40 KPa a 80 KPa, de presión de columna y 0,5 minutos a 1,0 minuto para el tiempo de presurizado) fue algo conservadora y no parece incluir las condiciones más favorables por lo que se decide diseñar un nuevo experimento en el que amplió este rango de 80 KPa a 150 KPa para la presión de columna y de 1,0 minuto a 2,0 minutos de tiempo de presurizado.

Tabla 10 Matriz de experimentos diseño Doehlert. X1: Presión de columna, X2: tiempo de presurizado.

Obs	Factores *		Respuestas (Área)						
	X1	X2	NG	NA	DFA	MC	EC	DBFT	DIPFT
1	1	0	$8,0 \times 10^6$	$1,8 \times 10^7$	$4,1 \times 10^7$	$1,0 \times 10^6$	$1,1 \times 10^6$	$7,3 \times 10^5$	$5,9 \times 10^5$
2	-1	0	$6,9 \times 10^6$	$8,8 \times 10^6$	$3,4 \times 10^7$	$8,5 \times 10^5$	$1,0 \times 10^6$	$5,9 \times 10^5$	$4,9 \times 10^5$
3	0,5	0,86602	$2,0 \times 10^7$	$8,3 \times 10^6$	$4,7 \times 10^7$	$1,7 \times 10^6$	$1,9 \times 10^6$	$1,9 \times 10^6$	$1,6 \times 10^6$
4	-0,5	-0,86602	$1,6 \times 10^7$	$5,6 \times 10^6$	$4,1 \times 10^7$	$1,2 \times 10^6$	$1,3 \times 10^6$	$1,5 \times 10^6$	$1,3 \times 10^6$
5	0,5	-0,86602	$2,1 \times 10^7$	$5,7 \times 10^6$	$4,4 \times 10^7$	$1,2 \times 10^6$	$1,6 \times 10^6$	$1,7 \times 10^6$	$1,5 \times 10^6$
6	-0,5	0,86602	$1,8 \times 10^7$	$4,8 \times 10^6$	$4,2 \times 10^7$	$1,2 \times 10^6$	$1,4 \times 10^6$	$1,6 \times 10^6$	$1,3 \times 10^6$
7	0	0	$1,9 \times 10^7$	$3,9 \times 10^6$	$4,2 \times 10^7$	$1,1 \times 10^6$	$1,4 \times 10^6$	$1,5 \times 10^6$	$1,3 \times 10^6$

* Los valores de los factores se encuentran codificados para eliminar el efecto de sus magnitudes diferentes durante la evaluación.

En la Tabla 10 se muestran los siete experimentos realizados en este nuevo diseño factorial, en el que la presión de columna se evalúa a cinco niveles y el tiempo de presurizado a tres niveles. También se presentan las respuestas experimentales obtenidas y utilizadas para la computación del modelo.

Los resultados del diseño experimental Doehlert fueron evaluados mediante el análisis de varianza (ANOVA) y comparación de los valores experimentales con los pronosticados por el modelo. Adicionalmente, es posible concluir que el modelo no sufre de falta de ajuste (*lack of fit*) porque el valor calculado de probabilidad de F fue superior a 0,05. De hecho, el modelo explica muy bien el comportamiento de los datos, lo cual se confirma por los buenos coeficientes de correlación (r^2) obtenidos (ver la Tabla 11).

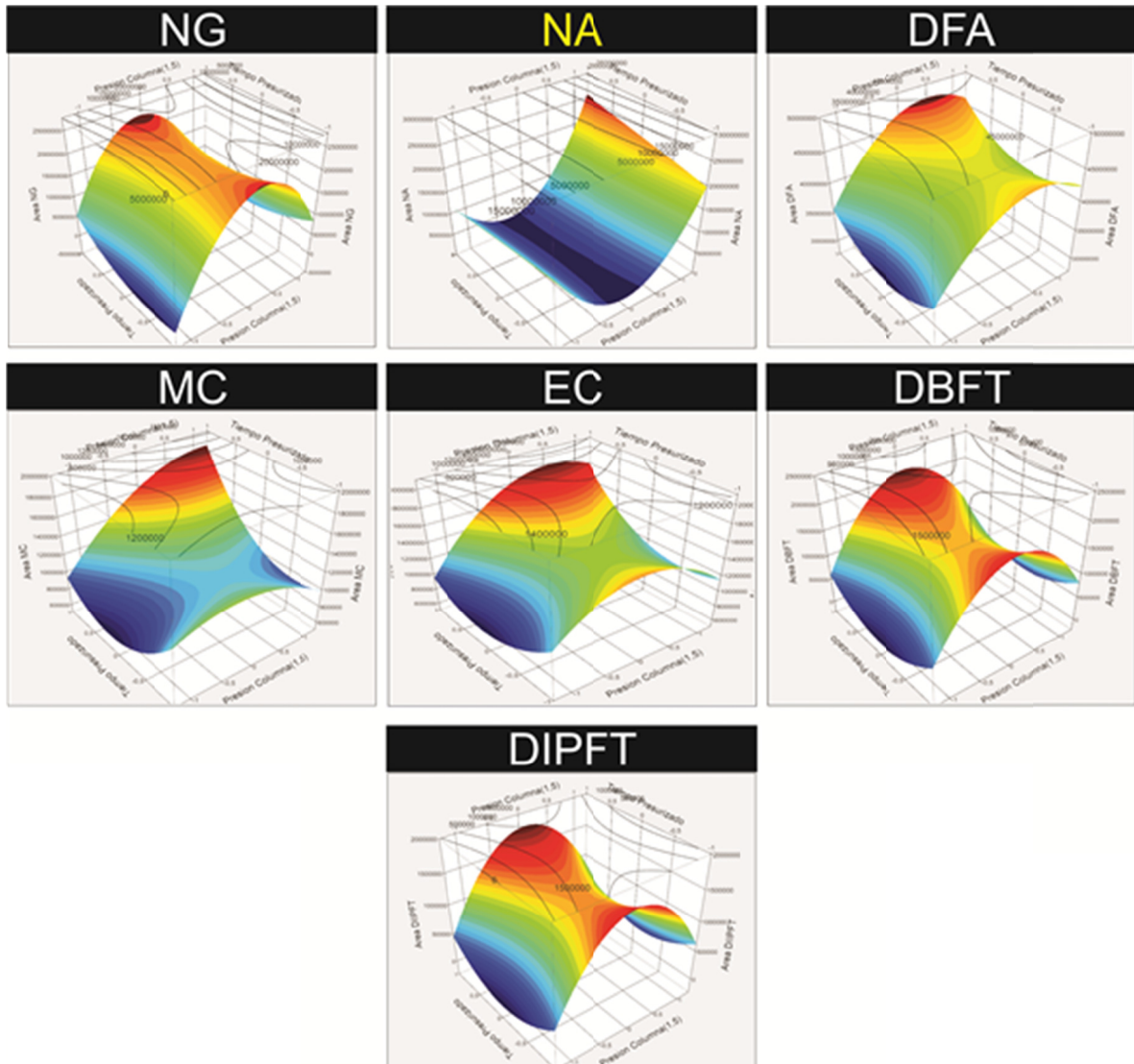
Tabla 11 Matriz de experimentos diseño Doehlert. X1: Presión de columna, X2: tiempo de presurizado.

	Ecuación polinomial del modelo polinomial de segundo orden	Falta de ajuste Pr>F	r ²
NG	Area = -82307015+(-138500000•X1)+(-5843320•X2)-(-47205716 •X1 ²) +(3225512,7•X2 ²)-(-4180227•X1•X2)	0,285	0,971
NA	Area = 98087617+(118480776•X1)+(6410904,3•X2)-(37143090•X1 ²)+(- 205438,8•X2 ²) -(3903354,3•X1•X2)	0,307	0,966
DFA	Area = 17692555+(-39379241•X1)+(2808372,6•X2)-(-15553914•X1 ²) +(3896739,5•X2 ²)-(1083517,9•X1•X2)	0,088	0,997
MC	Area = 173164+(-1519146•X1)+(831478,21•X2)-(-605438•X1 ²) +(379233,5•X2 ²)-(449574,57•X1•X2)	0,394	0,943
EC	Area = -639491+(-3009969•X1)+(617906,82•X2)-(-1117068•X1 ²) +(323817•X2 ²)-(334355,09•X1•X2)	0,578	0,867
DBFT	Area = -5310470+(-9334468•X1)+(295255,77•X2)-(-3212014•X1 ²) +(561191,83•X2 ²)-(138152,99•X1•X2)	0,263	0,975
DIPFT	Area = -4959101+(-8549622•X1)+(198044,71•X2)-(-2929546•X1 ²) +(458815,83•X2 ²)-(92081,594•X1•X2)	0,258	0,976

Las nuevas gráficas de superficie en 3D de presión de columna y tiempo de presurizado obtenidas con el nuevo modelo con un rango expandido (Figura 9) ahora permiten observar un nuevo comportamiento y para algunos compuestos toman forma de silla de montar, lo que permitirá identificar puntos máximos de respuesta.

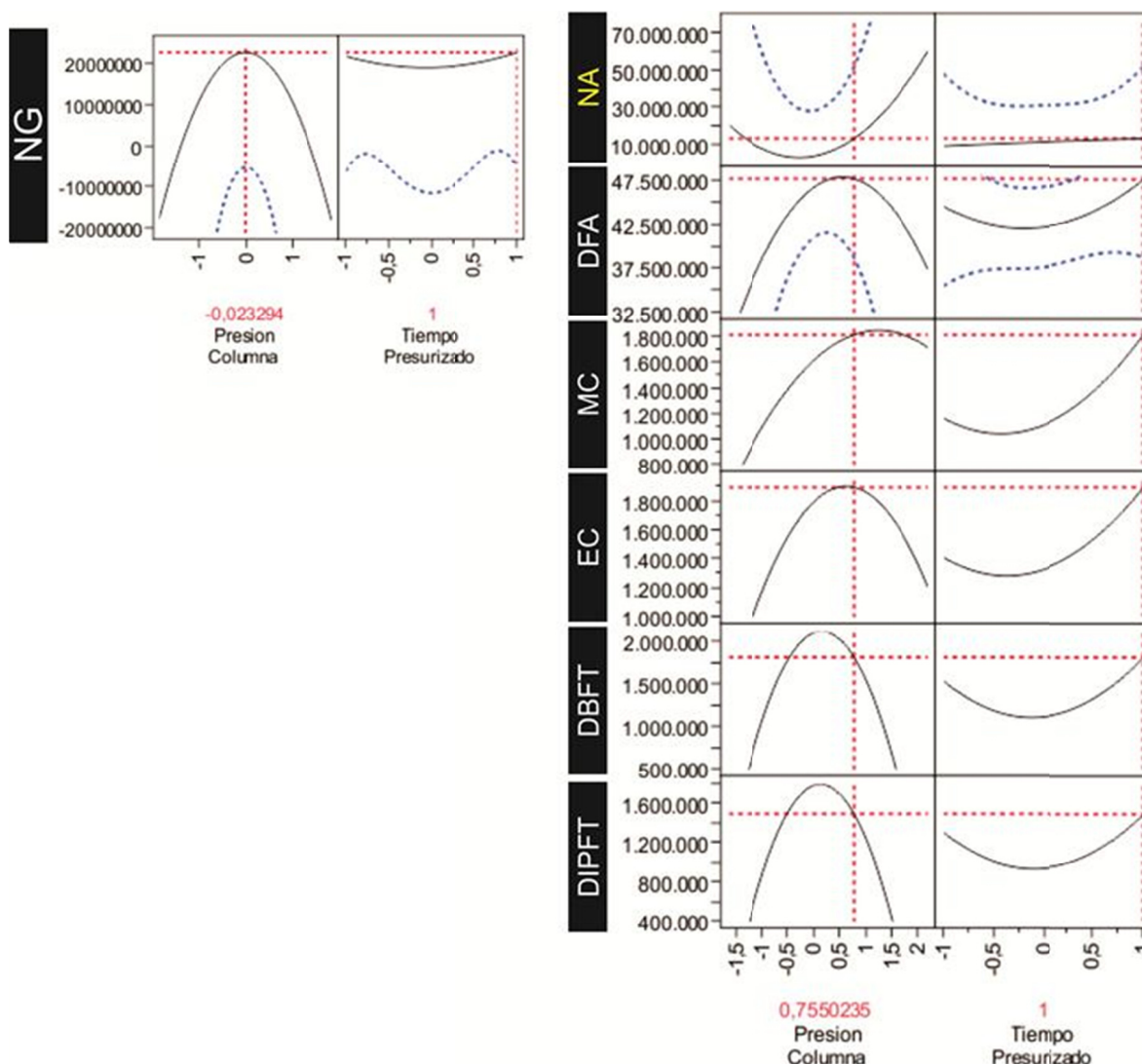
La superficie correspondiente a la naftilamina exhibe un comportamiento diferente y muestra que las condiciones óptimas de tiempo de presurizado y presión de columna se encuentran por fuera del rango estudiado, pero las condiciones empleadas de presión de columna corresponden a las máximas recomendadas por el fabricante.

Figura 9 Gráficas de superficie 3D diseño experimental rango expandido de presión de columna y tiempo de presurizado.



Para determinar los puntos máximos de las curvas de superficie el software estadístico empleado ofrece la posibilidad de estimarlos con la función de optimizado (*Maximize desirability*).

Figura 10 Optimización de la presión de columna y tiempo de presurizado para los componentes de las pólvoras sin humo.



En concordancia con lo pronosticado con los modelos anteriores, la nitroglicerina siguió presentando un comportamiento dispar respecto a los demás compuestos estudiados; por ese motivo se establecieron independientemente los valores óptimos de presión de columna en -0,23294 (unidades codificadas) correspondiente a 107 KPa y de tiempo de presurizado de 1 correspondiente a 2 minutos. Para el conjunto de los compuestos restantes el valor pronosticado de presión de columna con máxima respuesta fue 0,7550235 (unidades codificadas) correspondiente a 141,5 KPa y tiempo de presurizado de 2 minutos.

4.1.2.1 Parámetros instrumentales GC/MS

Después de la etapa de optimización se aplicaron dos métodos independientes, uno para la nitroglicerina y otro para los restantes compuestos, estableciéndose los parámetros que se describen a continuación:

Tabla 12 Condiciones automuestreador.

Solvente de lavado	Etanol
Enjuagues con solvente pre y post inyección	5
Enjuagues con la muestra	5
Velocidad de succión del émbolo de la microjeringa	Alta
Velocidad de inyección	Alta
Velocidad de inserción de la microjeringa	Alta
Modo de inyección	Normal
Ciclos de aspiración/descarga de la microjeringa	4
Tiempo de permanencia de la aguja de la microjeringa dentro del puerto de inyección	5 s
Espacio de aire terminal	No
Volumen de enjuague	8 µL

Tabla 13 Condiciones optimizadas del puerto de inyección.

	Método 1 Nitroglicerina	Método 2 (MC, EC, DFA, DBFT y DIPFT)
Temperatura del inyector (°C)	150	280
Gas de arrastre	Helio	Helio
Flujo (mL/min)	1	1
Volumen de inyección (µL)	2	2
Tiempo de muestreo – Splitless (min)	1	1
Inyección de alta presión		
• Presión de columna (KPa)	107	141,5
• Tiempo de presurizado (min)	2	2

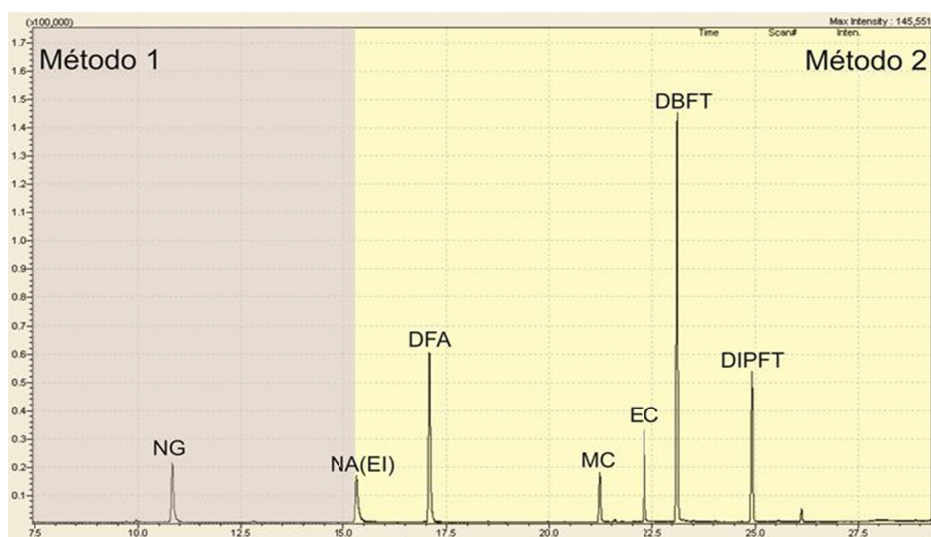
Tabla 14 Programación de temperaturas del horno.

Temperatura inicial	100 °C
Tiempo de sostenido	2 min
Temperatura final	298 °C
Incremento	6 °C/min
Tiempo de sostenido final	10 min
Tiempo total de la corrida cromatográfica	45 min

Tabla 15 Condiciones optimizadas del detector selectivo de masas.

	Método 1 Nitroglicerina	Método 2 (DFA, MC, EC, DBFT y DIPFT)
Temperatura de la interfase (°C)	250	250
Temperatura de la fuente de iones (°C)	170	250
Tiempo de corte de solvente (min)	3	3
Periodo de colección de datos <i>Event time</i> (s)	0,02	0,06
Modos de adquisición:		
• FASST para el análisis de pólvoras		
• SIM para el análisis de residuos		
	iones 46, 143	143, 149, 134, 120, 169

Figura 11 Cromatograma TIC obtenido bajo las condiciones optimizadas.



4.1.3 Validación de parámetros cromatográficos

Las ecuaciones necesarias para realizar los cálculos en ésta sección se encuentran detalladas en el ANEXO IV.

4.1.3.1 Determinación de la calidad de la separación cromatográfica

En la Figura 11 se observa que todos los compuestos estudiados están completamente resueltos. Un resumen del desempeño del sistema cromatográfico se sintetiza en la Tabla 16.

Tabla 16 Parámetros indicadores de la la calidad de la separación cromatográfica (n=10).

	Tiempo de retención (min)			k' *	N	Tailing**	Resolución
	tr	s	CV(%)				
Nitroglicerina	10,83	0,004	0,04	8,0	$3,0 \times 10^5$	1,3	-
Naftilamina	15,33	0,003	0,02	11,8	$3,5 \times 10^5$	1,5	49,1
Difenilamina	17,07	0,004	0,02	13,2	$1,0 \times 10^6$	1,1	19,8
Metilcentralita	21,21	0,004	0,02	16,7	$1,3 \times 10^6$	1,0	58,4
Etilcentralita	22,31	0,004	0,02	17,6	$1,5 \times 10^6$	1,0	15,0
Ftalato de dibutilo	23,12	0,004	0,02	18,3	$1,8 \times 10^6$	1,0	11,3
Ftalato de diisopentilo	24,93	0,004	0,02	19,8	$1,6 \times 10^6$	1,0	24,1

* 1,3 min t_m

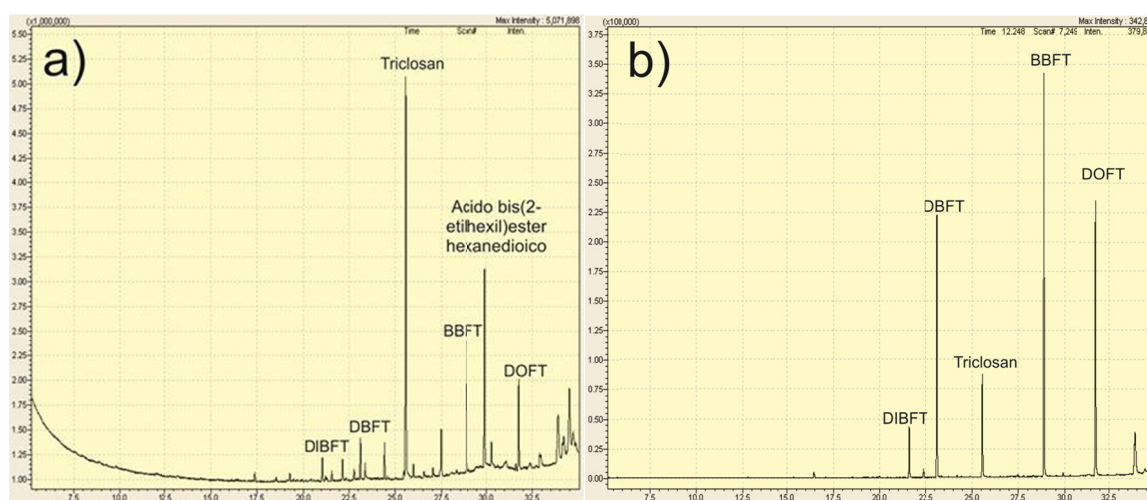
** Asimetría del pico cromatográfico

En la tabla anterior puede observarse la muy buena reproducibilidad de los tiempos de retención, representada por coeficientes de variación inferiores al 0,04%, lo que confirma la aplicabilidad del tiempo de retención como uno de los criterios a tener en cuenta para la identificación de los compuestos. Picos cromatográficos muy simétricos, hecho evidenciado por un factor de coleo (*Tailing*) para todos los compuestos muy cercano a 1,0. No existe problema de solapamiento de señales cromatográficas para los siete compuestos estudiados, lo que se manifiesta en los elevados valores de resolución. Los factores de capacidad altos indican que el tiempo de la corrida cromatográfica es largo, pero este hecho es intencionalmente provocado para evitar posibles interferencias provenientes de la matriz estudiada. Finalmente el número de platos teóricos es concordante con lo esperado para la columna capilar de 0,25 mm de diámetro interno utilizada.

4.1.3.2 Identidad y selectividad

Como en cualquier técnica de separación, la coelución de otros compuestos es muy factible en cromatografía de gases capilar y esta posibilidad se incrementa cuando se analizan muestras ambientales, de allí que se procedió a evaluar posibles interferentes en el análisis cromatográfico.

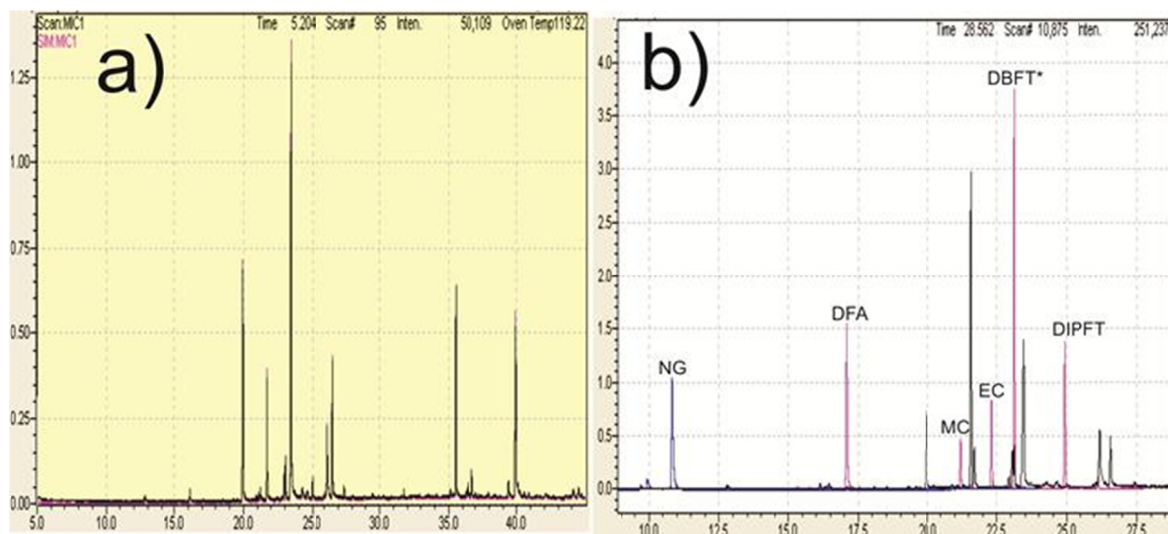
Figura 12 a) TIC del extracto obtenido de los hisopos comerciales de vástago plástico. modo FASST, b) MIC del mismo extracto.



Los cromatogramas de la Figura 12 corresponden a los extractos en acetona obtenidos al tratar los hisopos de algodón disponibles comercialmente y que son los empleados actualmente para realizar los frotis para el análisis de residuos de disparo por ICP-MS y absorción atómica. En ellos se observa la contribución de varios compuestos provenientes del vástago plástico como ftalato de diisobutilo (DIBFT), triclosán, ftalato de bencilbutilo (BBFT), ftalato de dioctilo (DOFT) entre otros compuestos de intensidad baja, pero principalmente la presencia del ftalato de butilo implica que se descarten éste tipo de hisopos para realizar el procedimiento de muestreo. En la Figura 12 (b) se aprecia una mejor línea base, pero aun persisten los plastificantes especialmente el ftalato de dibutilo.

Por lo anterior se decide de utilizar hisopos con vástago de madera para realizar los frotis del procedimiento de muestreo descrito en la metodología.

Figura 13 Cromatogramas MIC a) obtenido del frotis de una mano sin disparar. b) superposición con el cromatograma de la mezcla de patrones.



Bajo condiciones ideales, el procedimiento de tratamiento de la muestra debe producir extractos libres de compuestos interferentes pero, lamentablemente, cuando se trabaja con muestras reales esto rara vez ocurre. La Figura 13(a) corresponde al cromatograma en modo SIM de un extracto obtenido al realizar el frotis sobre el dorso de la mano de una persona que no había disparado ni había estado en contacto con armas de fuego, allí puede apreciarse la aparición de varias señales cromatográficas, posiblemente ácidos grasos de bajo peso molecular y ácidos alifáticos volátiles originados por las glándulas sudoríparas y sebáceas. La Figura 13(b) corresponde a la superposición del cromatograma de la Figura 13(a) con el cromatograma de la mezcla de patrones en la que se aprecia que el pico cromatográfico correspondiente al ftalato de dibutilo queda solapado lo que impidió determinar este compuesto en muestras reales.

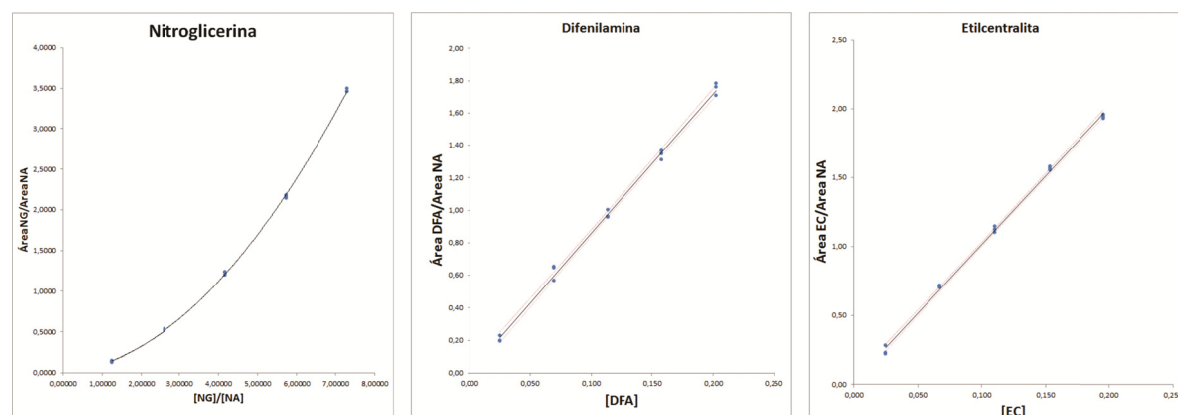
4.1.3.3 Linealidad

Sólo se determinó éste parámetro para la nitroglicerina, la difenilamina y la etilcentralita; se descartó el ftalato de dibutilo pues, como se mostró en la sección anterior, presentaba

coelución con compuestos provenientes de la matriz y no se contaba con patrones de metilcentralita y de ftalato de diisopentilo.

La respuesta del detector selectivo de masas (relativa al área del pico cromatográfico) fue linealmente dependiente con la concentración para la difenilamina en el rango comprendido entre 0,025 mg/L y 0,22 mg/L, mientras que para la etilcentralita, lo fue en el rango comprendido entre 0,024 mg/L y 0,196 mg/L. Sin embargo, la respuesta de la nitroglicerina no fue lineal ajustándose más a una función polinomial de segundo orden comportamiento también fue reportado por Dalby y Birkett⁵.

Figura 14 Curvas de calibración para la nitroglicerina, difenilamina y etilcentralita.



Las gráficas de la regresión polinomial de segundo grado, para la nitroglicerina, y lineal, para la difenilamina y metilcentralita, pasan por el origen ya que el intercepto con el eje y (término a) es estadísticamente igual a 0 puesto que el valor de $\text{Pr} > |t_a|$ es mayor que 0,05 (ver Tabla 17). Los coeficientes de correlación r^2 son superiores a 0,990 lo que indica su buen ajuste al modelo respectivo. Sin embargo, la sola observación de r^2 no es suficiente por lo que se verifica el resultado de la prueba de falta de ajuste (*lack of fit*) obteniéndose que para los tres compuestos estudiados el valor de $\text{Pr} > F_2$ es mayor que 0,05 lo que indica el alto ajuste de los datos obtenidos experimentalmente con los modelos polinómico y lineal.

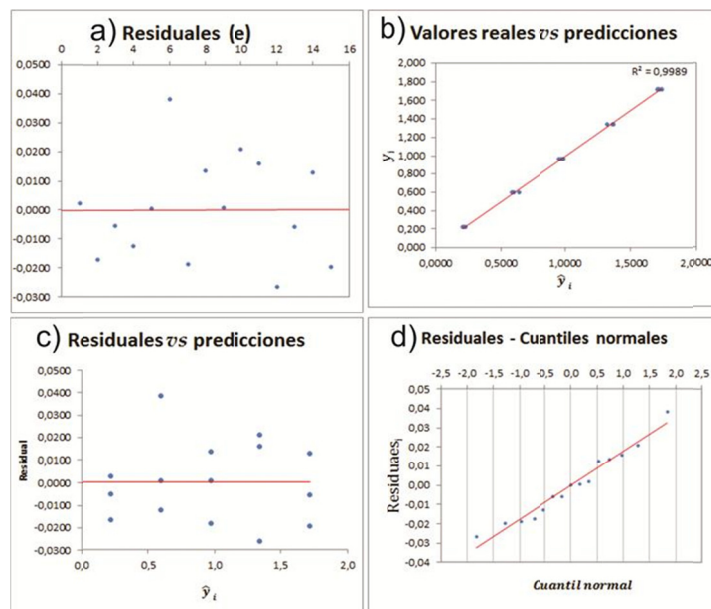
Tabla 17 Parámetros de regresión de los modelos polinómico y lineal.

	Modelo polinomial	Modelo lineal	
	Nitroglicerina	Difenilamina	Etilcentralita
a	0,03	$-6,0 \times 10^{-4}$	$-9,0 \times 10^{-4}$
s_a	0,06	0,01	0,02
$\text{Pr} > t_a $	0,42	0,72	0,45
b	0,08	8,63	10,20
s_b	0,03	0,10	0,12
$\text{Pr} > t_b $	0,09	0,00	0,00
c	0,06	-	-
s_c	0,004	-	-
$\text{Pr} > t_c $	0,00	-	-
s_{xy}	0,06	0,03	0,03
r^2	0,9982	0,9980	0,9979
F_0 (prueba Levene)	2,54	1,90	1,42
$\text{Pr} > F_0$	0,12	0,21	0,43
F_1	4566,1	9055,4	11738,6
$\text{Pr} > F_1$	0,00	0,00	0,00
F_2	0,49	0,45	1,99
$\text{Pr} > F_2$	0,69	0,74	0,55

La validez de los modelos para los tres compuestos estudiados se confirmó mediante el análisis de residuales (e) en la Figura 15(a) en donde los residuales se distribuyen aleatoriamente, es decir, sin presentar tendencia alguna. La Figura 15(b) muestra la correspondencia entre los valores estimados por los modelos y los valores obtenidos experimentales siendo una línea recta un indicativo del buen ajuste al modelo.

Para evaluar la homocedasticidad se recurre a la Figura 15(c) en donde al representar los valores de los residuales contra los pronosticados por el modelo (\hat{y}_i) se observa una distribución aleatoria hecho que es confirmado por los resultados de la prueba de Levene $\text{Pr} > F_0$ que en todos los casos fue superior a 0,05 (ver Tabla 17) demostrando la homogeneidad de varianzas. La Figura 15(d) de los residuales contra sus cuantiles normalizados, muestra que los residuales se distribuían alrededor de una línea recta sin mostrar desviaciones significativas, con lo cual se cumple el segundo requisito para poder aplicar un análisis de varianza ANOVA, la normalidad de los residuales.

Figura 15 Gráficas de diagnóstico para la difenilamina.



Los valores de la Tabla 17 correspondientes a $Pr > |t_b|$, para difenilamina y etilcentralita y $Pr > |t_c|$, para nitroglicerina, ofrecen la misma información que el valor de $Pr > F_1$ del análisis ANOVA, en todos los casos fueron iguales a 0, lo que indica que para todos los casos la pendiente es significativamente diferente de cero.

4.1.3.4 Límites de detección y cuantificación

Los límites de detección y cuantificación fueron obtenidos a partir de la metodología del análisis de la relación señal-ruido y usando los parámetros de la curva de calibración (descritas en el ANEXO IV)

- **Relación señal-ruido:** Para determinar el límite de detección con esta metodología, se compararon las señales producidas por soluciones de baja concentración del analito. La relación señal ruido fue determinada gracias a la función que para ese propósito dispone el software GCMSsolution. La Tabla 18 muestra los límites de detección y cuantificación obtenidos con esta metodología, sin embargo, estos valores pueden considerarse subjetivos pues se obtuvieron a error y ensayo además que se ven influenciados por las condiciones cromatográficas, vida de la columna, estabilidad de la línea base y efectos de la matriz.

Tabla 18 Comparación entre los límites de detección y cuantificación obtenidos por los métodos empleados (volumen de inyección 2 μ L).

	LD (mg/L)		LC (mg/L)	
	Relación señal-ruido	Regresión $s_{y/x}$	Relación señal- ruido	Regresión $s_{y/x}$
NG	0,09	-	0,10	-
DFA	0,004	0,010	0,006	0,03
EC	0,004	0,009	0,005	0,03

$s_{y/x}$, desviación estándar de los residuales de la curva de regresión lineal.

- *Desviación estándar de la respuesta.* La Tabla 18 contiene los límites de detección y cuantificación encontrados para los tres compuestos estudiados empleando para su determinación la desviación estándar de los residuales de la curva de calibración $s_{y/x}$. Los límites de detección y cuantificación para la nitroglicerina no se determinaron con esta metodología pues no se obtuvo un comportamiento lineal entre la concentración y la respuesta del equipo.

Los valores de la Tabla 18 indican que no todas las metodologías empleadas para estimar los límites de detección y cuantificación arrojan resultados similares. Los límites obtenidos a partir de la desviación estándar de los residuales, $s_{y/x}$, son mayores que los obtenidos con las otras metodologías, por lo que es necesario que en la descripción de la validación de un método analítico se especifique la metodología empleada para el cálculo de estos los límites.

La nitroglicerina presenta límites de detección y cuantificación aproximadamente de un orden de magnitud más altos que los de la difenilamina y la etilcentralita esto debido a su naturaleza lábil.

4.1.3.5 Exactitud

Conjuntamente con la estimación de la linealidad se llevó a cabo un pseudo-programa de ensayos interlaboratorios sobre muestras simuladas (*dopadas*) con nitroglicerina, difenilamina y etilcentralita a cuatro niveles de concentración. Cada solución fue

inyectada por triplicado y con los valores de áreas del respectivo componente junto con las áreas del patrón interno, naftilamina, se estimaron sus concentraciones correspondientes. Luego, mediante el empleo de una hoja de cálculo de Microsoft Excel versión 14.0 especialmente diseñada se estimaron los parámetros exigidos por la normas de la serie NTC-3529 para establecer la precisión y veracidad del método desarrollado (Ver el ANEXO IV).

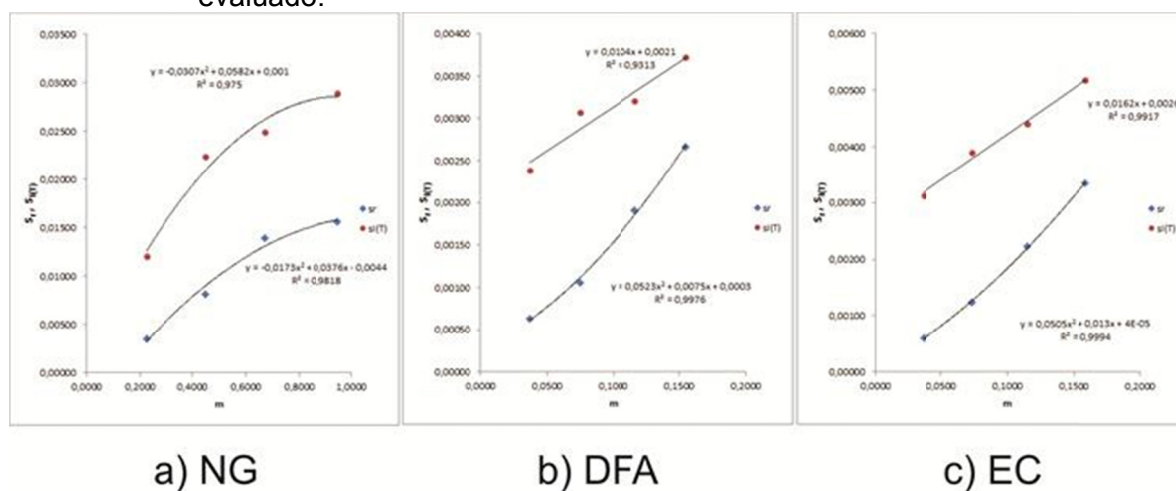
Tabla 19 Estimación de la repetibilidad, precisión intermedia y del sesgo de laboratorio para la NG, DFA y EC.

Compuesto	Parámetro	Nivel			
		1	2	3	4
NG	s_r	0,004	0,008	0,014	0,016
	$s_{I(T)}$	0,012	0,022	0,025	0,029
	$\bar{\bar{y}}$	0,225	0,449	0,670	0,949
	μ	0,275	0,550	0,825	1,100
	%Recuperación	81,7	81,6	81,2	86,3
	$\hat{\Delta}$	-0,050	-0,101	-0,155	-0,151
	$\hat{\Delta}-A_{s_{I(T)}}$	-0,061	-0,120	-0,175	-0,174
	$\hat{\Delta}+A_{s_{I(T)}}$	-0,040	-0,083	-0,136	-0,129
	Criterio de aceptación	0,005	0,009	0,009	0,010
	$\hat{\Delta}_m/2$	0,110	0,220	0,330	0,440
DFA	s_r	0,001	0,001	0,002	0,003
	$s_{I(T)}$	0,002	0,003	0,003	0,004
	$\bar{\bar{y}}$	0,037	0,075	0,117	0,155
	μ	0,051	0,101	0,152	0,202
	%Recuperación	73,4	73,7	77,1	76,7
	$\hat{\Delta}$	-0,013	-0,027	-0,035	-0,047
	$\hat{\Delta}-A_{s_{I(T)}}$	-0,016	-0,029	-0,037	-0,050
	$\hat{\Delta}+A_{s_{I(T)}}$	-0,011	-0,024	-0,032	-0,044
	Criterio de aceptación	0,001	0,001	0,001	0,001
	$\hat{\Delta}_m/2$	0,020	0,040	0,061	0,081
EC	s_r	0,001	0,001	0,002	0,003
	$s_{I(T)}$	0,003	0,004	0,004	0,005
	$\bar{\bar{y}}$	0,037	0,074	0,115	0,159
	μ	0,049	0,098	0,147	0,196
	%Recuperación	74,5	75,3	78,2	80,9
	$\hat{\Delta}$	-0,013	-0,024	-0,032	-0,037
	$\hat{\Delta}-A_{s_{I(T)}}$	-0,015	-0,028	-0,036	-0,041
	$\hat{\Delta}+A_{s_{I(T)}}$	-0,010	-0,021	-0,029	-0,034
	Criterio de aceptación	0,001	0,002	0,002	0,002
	$\hat{\Delta}_m/2$	0,020	0,039	0,059	0,078

Para evaluar la precisión se observan los valores de las desviaciones estándar de repetibilidad (s_r) y de precisión intermedia ($s_{I(T)}$) para los diferentes niveles de concentración de nitroglicerina, difenilamina y etilcentralita de la Tabla 19. Estas desviaciones tienden a aumentar al aumentar la media a largo plazo de cada nivel (\bar{y}) por lo que es permisible establecer alguna relación funcional.

En la Figura 16 se observa este comportamiento, que aunque no en todos los casos es lineal parece ajustarse a un modelo polinómico de segundo grado, que fue determinado con la función línea tendencia de Microsoft Excel versión 14.0.

Figura 16 Relación entre s_r y $s_{I(T)}$ con la media de concentración para cada nivel evaluado.



En cuanto a la evaluación de la veracidad, en la Tabla 19 se puede observar que el rango comprendido entre $\hat{\Delta} - As_{I(T)}$ y $\hat{\Delta} + As_{I(T)}$ para los cuatro niveles de concentración de nitroglicerina, difenilamina y etilcentralita no incluyen el cero y los valores respectivos son negativos, lo que indica que el método pronostica un valor inferior al valor aceptado (μ). Adicionalmente, el valor absoluto del sesgo del laboratorio, $|\hat{\Delta}|$, es mayor al criterio de aceptación, calculado según la Ecuación 20, lo que implica que la diferencia entre la media a largo plazo (\bar{y}) y el valor aceptado es estadísticamente significativa. No obstante, si se tiene en cuenta que, según la AOAC³², para concentraciones de analitos en el rango de 0,1 mg/L a 100 mg/L el valor aceptable de recuperación oscila entre el 80% y 110%, se

pueden establecer para cada nivel los valores de $\hat{\Delta}_m/2$ que aparecen en la última fila de Tabla 19, la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** y la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**, éstos son superiores al valor absoluto del sesgo del laboratorio, $|\hat{\Delta}|$, en su respectivo nivel indicando que no queda probado que el sesgo a largo plazo del método sea inaceptable.

4.1.4 Aplicación de la metodología a muestras reales

4.1.4.1 Comparación de la composición de la pólvora de diferentes tipos de munición

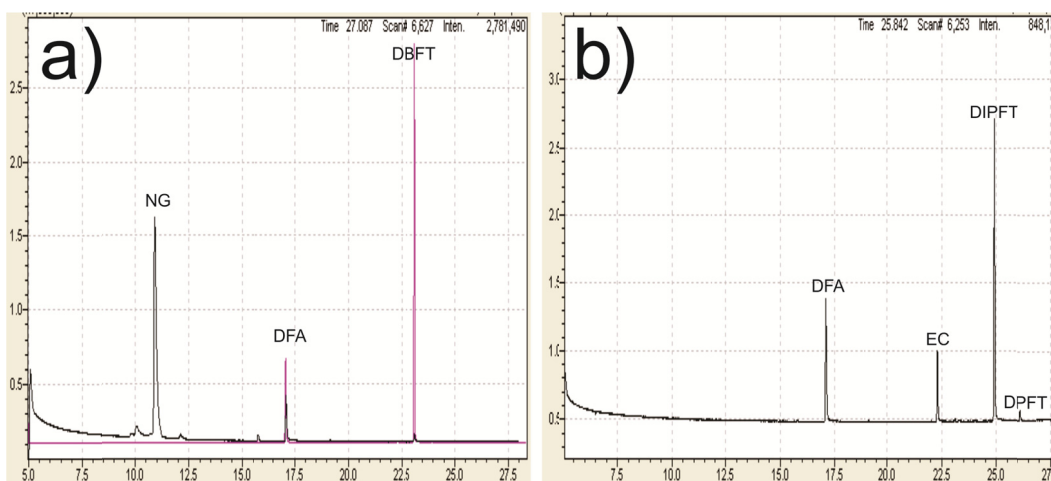
De los diferentes tipos de munición con que se contaba se realizaron las extracciones descritas en la metodología y los resultados obtenidos se consignan en la Tabla 20.

Tabla 20 Composición establecida para las pólvoras de la munición disponible.

Tipo de munición		Compuestos detectados
M1	9 mm Águila	NG, EC y DBFT
M2	9 mm Indumil nato	NG, DFA y EC
M3	38 L Indumil	NG, DFA y DBFT
M4	.32 largo Indumil	NG, DFA y DBFT
M5	.22 Remington	NG, DFA, EC y DBFT
M6	7.65 Indumil	NG, DFA y DBFT
M7	7.65 Remington	NG, DFA, EC y DBFT
M8	.25 Auto Sellier & Bellot	DFA, MC, EC y DBFT
M9	.25 Auto Olin Corp. Win	NG, DFA, MC, EC y DBFT
M10	.32 corto Companhia Brasileira de cartuchos	DFA y DBFT
M11	.380 Auto Águila	NG, EC y DBFT
M12	.380 Auto Lapuan Patruunatehdas	DFA, EC y DBFT
M13	.380 Auto Sellier & Bellot	DFA, EC y DBFT
M14	.380 Recalzado	NG, DFA, EC y DBFT
M15	9 mm Recalzado	NG, DFA, EC y DBFT
M16	.38 corto Remington Arms	DFA y DBFT
M17	9 mm Bermington Arms Company	NG, DFA, EC y DBFT
M18	.32 Largo Winchester-Western	NG, DFA, EC y DBFT
M19	.357 Magnum Hirtenberger Patronen	DFA, EC, DBFT, DIPFT y DPFT

De la tabla anterior puede apreciarse que los compuestos empleados en la elaboración de las pólvoras de los cartuchos varían con respecto al fabricante, así, el plastificante ftalato de dibutilo se constituye como el componente común a todas las pólvoras estudiadas, con excepción de la munición 9 mm nato de Indumil. Otra excepción se encuentra con la munición mexicana El Águila que no emplea en su composición el estabilizante difenilamina. La nitroglicerina está ausente en municiones como .25 Auto Sellier & Bellot, .32 corto Companhia Brasileira de cartuchos, 380 Auto Lapuan Patruunatehdas, .380 Auto Sellier & Bellot, 38 corto Remington Arms y .357 Magnum Hirtenberger Patronen. La metilcentralita sólo aparece en las municiones .25 Auto Sellier & Bellot y .25 Auto Olin Corp. Win mientras que el ftalato de isopentilo sólo es empleado en la munición .357 Magnum Hirtenberger Patronen. La Figura 17 corresponde a los cromatogramas de la munición colombiana Indumil para revólver 38 L y la austriaca .357 Magnum Hirtenberger Patronen, en ella se pueden apreciar las diferencias en cuanto a su composición.

Figura 17 Cromatogramas TIC de la pólvora de la munición a) 38 L Indumil y b) .357 Magnum Hirtenberger Patronen.



MacCrehan y colaboradores²⁷ y Zeichner³⁰ reportaron que la relación cantidad de propelente con cantidad de estabilizante (P/S) puede usarse para asociar los residuos orgánicos de disparo con la pólvora no quemada, presente en la munición. Por consiguiente las relaciones de áreas de pico de NG/DFA, NG/EC, NG/DBFT, DFA/EC y DFA/DBFT obtenidas a partir de los cromatogramas de muestras de los diferentes tipos de munición analizados (Tabla 21) fueron escogidas como variables para el análisis de

componentes principales. Los datos se procesaron estadísticamente mediante el paquete estadístico JMP versión 10.0.0. Dicho programa es un paquete extensible para análisis exploratorio de datos, clasificación y regresión.

Tabla 21 Relación de áreas de los compuestos encontrados en cada tipo de munición analizada.

	NG/DFA	NG/EC	NG/DBF	DFA/EC	DFA/DBF
1 9 mm Águila	0,0	31,3	1176,3	0,0	0,0
2 9 mm Indumil nato	6,4	4,0	0,0	0,6	0,0
3 38 largo Indumil	1,2	0,0	0,7	0,0	0,6
4 32 largo Indumil	124,6	0,0	42,7	0,0	0,3
5 .22 Remington	1092,4	9,4	2715,4	0,0	2,5
6 7.65 Indumil	16,1	0,0	4,4	0,0	0,3
7 7.65 Remington	177,3	5826,9	147,9	32,9	0,8
8 .25 Auto Sellier & Bellot	0,0	0,0	0,0	1,2	194,2
9 .25 Auto Olin Corp. Win	37,1	1269,7	190,3	34,2	5,1
10 .32 corto Companhia Brasileira de cartuchos	0,0	0,0	0,0	0,0	491,8
11 .380 Auto Águila	0,0	19,9	692,4	0,0	0,0
12 .380 Auto Lapuan Patruunatehdas	0,0	0,0	0,0	186,5	70,2
13 .380 Auto Sellier & Bellot	0,0	0,0	0,0	712,8	266,1
14 .380 Recalzado	14,7	409,5	45,6	27,8	3,1
15 9 mm Recalzado	5,9	381,0	41,4	64,4	7,0
16 .38 corto Remington Arms	0,0	0,0	0,0	0,0	904,1
17 9 mm Bermington Arms Company	766,9	17,0	906,4	0,0	1,2
18 .32 Largo Winchester-Western	49,7	2394,1	92,6	48,2	1,9
19 .357 Magnum Hirtenberger Patronen	0,0	0,0	0,0	2,0	36,3

El análisis de componentes principales es un método de análisis multivariable usado en la interpretación de una matriz de datos con muchas variables. El principio de éste procedimiento estadístico se basa en la construcción de nuevas variables y la reducción de la matriz inicial. Esta simplificación de los datos se logra usando combinaciones lineales de las variables originales que permiten la adecuada visualización de los resultados agrupándolos de acuerdo a sus similitudes. Luego los nuevos datos provenientes de estas combinaciones forman los componentes principales los cuales pueden ser graficados como valores y pesos en diagramas bi o tridimensionales. Los valores y pesos representan, respectivamente, la distribución de las muestras y la influencia de las variables. La gráfica de componentes principales está formada por vectores que representan las coordenadas de varianza.

El análisis por componentes principales se hizo autoescalando los datos originales. A partir de las nuevas matrices de datos. El software calculaba los pesos (*loadings*) de cada variable original en las nuevas variables, o componentes principales, y también los *scores* o valores que tenían las muestras originales en el nuevo sistema de variables. Adicionalmente, se emplearon los diagramas biplot, que representan conjuntamente los *loadings* y *scores*.

Tabla 22 Matriz de correlación de las relaciones de los componentes de las municiones analizadas.

	NG/DFA	NG/EC	NG/DBFT	DFA/EC	DFA/DBF
NG/DFA	1				
NG/EC	-0,003	1			
NG/DBFT	0,833	-0,108	1		
DFA/EC	-0,142	-0,052	-0,167	1	
DFA/DBF	-0,192	-0,180	-0,221	0,128	1

La matriz de correlación muestra un importante factor de correlación (*r*) de 0,8 entre la relación NG/DFA y NG/DBFT lo que indica que existe cierto grado de correlación entre estas dos variables.

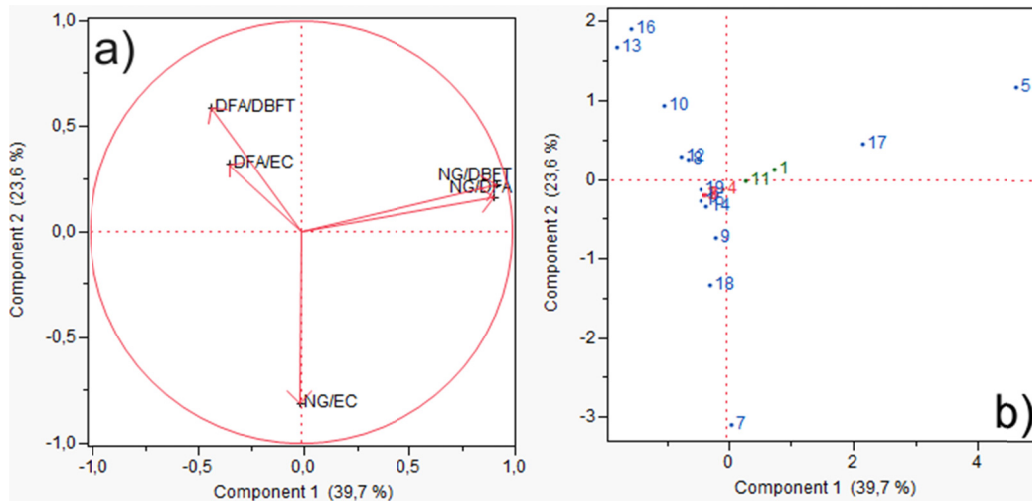
Tabla 23 *Loadings* de las 5 componentes principales calculadas con las relaciones de áreas de pico de los cromatogramas de las municiones estudiadas.

	CP1	CP2	CP3	CP4	CP5
NG/DFA	0,91	0,16	0,15	0,21	-0,27
NG/EC	-0,01	-0,81	0,26	0,52	0,04
NG/DBFT	0,92	0,22	0,09	0,08	0,28
DFA/EC	-0,34	0,32	0,88	-0,06	0,01
DFA/DBFT	-0,43	0,59	-0,19	0,66	0,02
Proporción de la varianza total	39,7%	23,6%	18,3%	15,2%	3,17%

Partiendo de los datos el programa calculó los pesos o *loadings* correspondientes a cada variable original (Tabla 23). En negrita se muestran los *loadings* de mayor peso dentro de cada variable original. En la primera componente principal o CP1 se aprecia mayor peso de las relaciones NG/DFA y NG/DBFT. Mientras que la CP2 está más correlacionada con

la relación NG/EC. Estas dos componentes explicaban un 63,6% del total de la varianza de los datos.

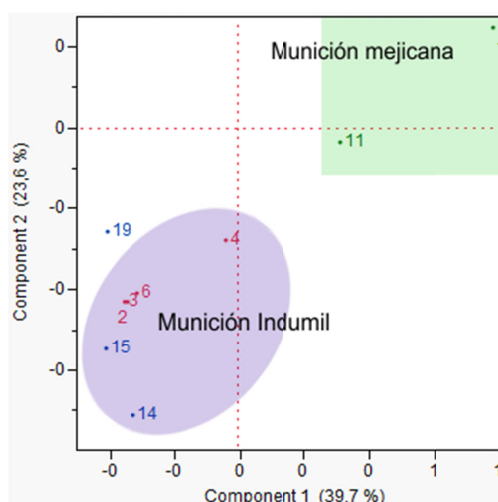
Figura 18 Gráfico Biplot del análisis de componentes principales CP1 y CP2 para las pólvoras de las municiones estudiadas. a) Variables originales con sus respectivos *loadings* b) las muestras según sus *scores*.



Al ubicar las muestras dentro de estas nuevas coordenadas se pueden apreciar ciertas características, la munición etiquetada como 5 en la Figura 18(b) correspondiente a la munición .22 Remington se ubica al extremo superior derecho de la gráfica indicando que posee una mayor relación de NG/DFA y NG/DBFT, y una muy baja relación NG/EC, DFA/EC y DFA/DBFT. La munición 7.65 Remington, identificada como 7, presenta una mayor relación NG/EC.

La Figura 19 corresponde a un acercamiento de la Figura 18(b) en la que se puede observar también la capacidad de agrupar de esta metodología ya que las municiones mexicanas, etiquetadas como 1 y 11 (9 mm y .380 respectivamente), quedaron ubicadas muy próximamente. También quedaron situadas en posiciones contiguas las municiones colombianas 9 mm (2), .38 Largo (3), .32 Largo (4) y 7.65 (6) y las municiones .380 recalzado (14) y 9 mm recalzado (15) que corresponden a munición elaborada por algunos clubes de tiro que emplean pólvora manufacturada por Indumil.

Figura 19 Ampliación de la escala de la Figura 18(b), zona en la que se ubican las municiones colombianas y mejicanas.



Esta metodología puede considerarse una herramienta valiosa para la asociación de los resultados obtenidos con el origen de la munición.

4.1.4.2 Comparación de la composición de los residuos de disparo

La metodología optimizada y validada se empleó para el análisis de muestras provenientes del frotis del dorso y la palma de las manos de voluntarios que habían realizado disparos y los resultados se consignan en la Tabla 24.

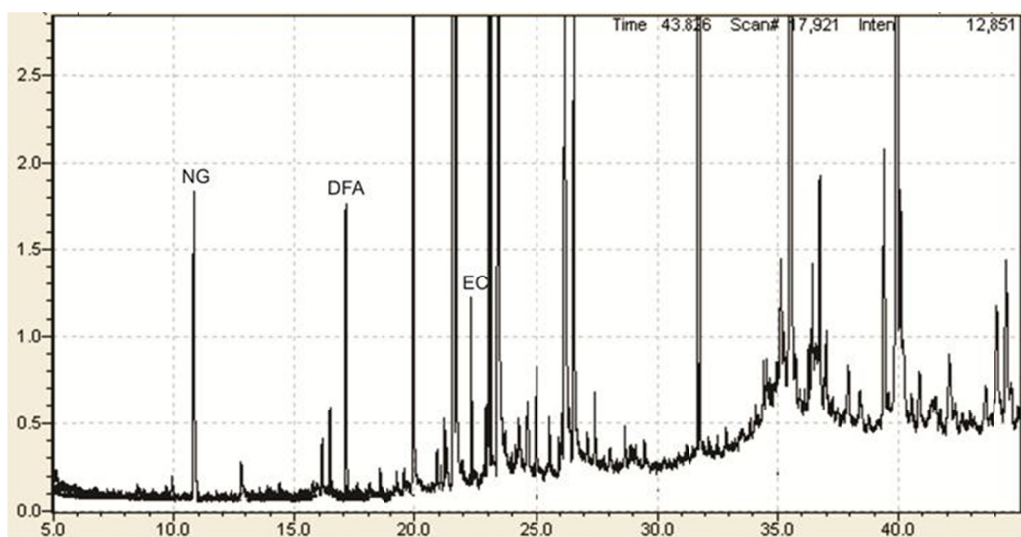
De la Tabla 24 puede observarse que los compuestos que fueron detectados en los residuos de disparo provenientes de munición 9 mm de Indumil fueron nitroglicerina, difenilamina y etilcentralita, para la munición 9 mm de Luger fueron difenilamina y etilcentralita, mientras que para la munición 38 largo fueron nitroglicerina y difenilamina. La Figura 20 corresponde a un cromatograma obtenido bajo las condiciones cromatográficas optimizadas para un residuo de disparo proveniente de una pistola Smith Wesson con munición 9 mm de Indumil.

Tabla 24 Compuestos encontrados en las muestras provenientes del frotis del dorso de la mano derecha de los voluntarios que realizaron disparos.

	Código arma *	Munición	Compuestos		Código arma *	Munición	Compuestos
1	P1	Luger 9mm	DFA-EC	16	P5	Indumil 9mm Lote 55	DFA-EC
2	P2	Indumil 9mm Lote 55	NG-DFA-EC	17	P2	Luger 9mm	DFA-EC
3	F1	Indumil 5,53	NG-EC	18	R1	Indumil 38 largo	NG-DFA
4	P3	Indumil 9mm Lote 55	NG-DFA-EC	19	R2	Indumil 38 largo	NG-DFA
5	P4	Indumil 9mm Lote 55	NG-DFA-EC	20	R3	Indumil 38 largo	NG-DFA
6	P5	Indumil 9mm Lote 55	NG-DFA-EC	21	R4	Indumil 38 largo	NG-DFA
7	P1	Indumil 9mm Lote 55	NG-DFA-EC	22	R1	Indumil 38 largo	NG-DFA
8	P2	Indumil 9mm Lote 55	NG-DFA-EC	23	R2	Indumil 38 largo	NG-DFA
9	P3	Indumil 9mm Lote 55	NG-DFA-EC	24	R3	Indumil 38 largo	NG-DFA
10	P4	Indumil 9mm Lote 55	NG-DFA-EC	25	R4	Indumil 38 largo	NG-DFA
11	P5	Indumil 9mm Lote 63	NG-DFA-EC	26	R1	Indumil 38 largo	NG-DFA
12	P1	Indumil 9mm Lote 55	NG-DFA-EC	27	R2	Indumil 38 largo	NG-DFA
13	P2	Indumil 9mm Lote 63	NG-DFA-EC	28	R3	Indumil 38 largo	NG-DFA
14	P3	Indumil 9mm Lote 63	NG-DFA-EC	29	R4	Indumil 38 largo	NG-DFA
15	P4	Indumil 9mm Lote 63	NG-DFA-EC	30	R1	Indumil 38 largo	NG-DFA

* Código arma de fuego empleada según Tabla 6.

Figura 20 Cromatograma de un residuo de disparo proveniente de una pistola Smith Wesson con munición 9 mm Indumil.



No se detectaron los analitos de interés en las muestras provenientes del frotis de la palma la mano derecha, con que se realizó el disparo, ni del dorso y palma de la mano izquierda.

Tabla 25 Relación de áreas de los compuestos encontrados en cada residuo de disparo analizado.

Código arma	NG/DFA	NG/EC	DFA/EC
P1	0	0	10,47
P2	0,22	0,11	0,50
F1	0,00	0,01	0,00
P3	0,23	0,18	0,79
P4	0,42	0,52	1,24
P5	0,30	0,53	1,77
P1	0,28	0,54	1,91
P2	0,30	0,56	1,86
P3	0,42	0,76	1,81
P4	0,61	0,88	1,45
P5	1,13	2,01	1,78
P1	0,89	0,83	0,93
P2	1,72	1,37	0,79
P3	1,34	2,21	1,64
P4	1,01	2,02	2,01

Código Arma	NG/DFA	NG/EC	DFA/EC
P5	0	0	0,41
P1	0	0	8,92
R1	0,51	0	0
R2	0,54	0	0
R3	0,46	0	0
R1	0,56	0	0
R2	0,47	0	0
R3	0,59	0	0
R1	0,69	0	0
R2	0,52	0	0
R3	0,56	0	0
R1	0,47	0	0
R2	0,49	0	0
R3	0,80	0	0
R1	0,69	0	0

Al igual que con las pólvoras de las municiones, también se realizó un análisis de componentes principales tomando las relaciones de áreas de pico de NG/DFA, NG/EC y DFA/EC como variables para el análisis. Los datos de la Tabla 25 se procesaron estadísticamente mediante el paquete estadístico JMP versión 10.0.0.

Al comparar las relaciones de áreas de pico de NG/DFA y NG/EC para pistolas de la Tabla 25 con los de la Tabla 21 (munición 9mm Indumil), se aprecia una disminución atribuible a la descomposición de la nitroglicerina durante el proceso de disparo.

La matriz de correlación de la Tabla 26 muestra un importante factor de correlación (r) de 0,7 entre la relación NG/DFA y NG/EC lo que indica que existe cierto grado de correlación entre estas dos variables.

Tabla 26 Matriz de correlación de las relaciones de los componentes de los residuos orgánicos de disparo analizados.

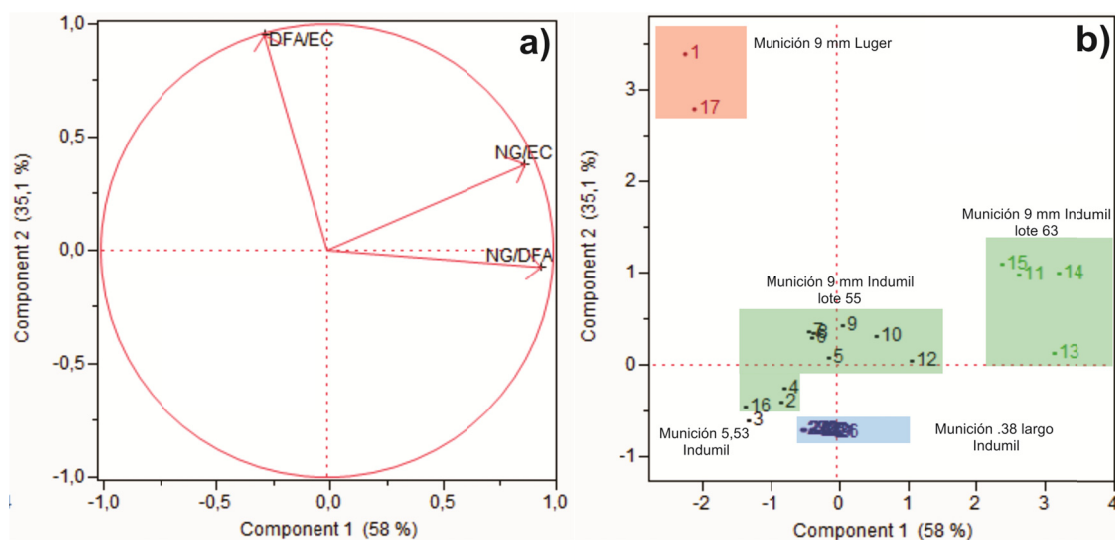
	NG/DFA	NG/EC	DFA/EC
NG/DFA	1		
NG/EC	0,71	1	
DFA/EC	-0,29	0,08	1

Partiendo de los datos autoescalados el programa JMP calculó los pesos o *loadings* correspondientes a cada variable original (Tabla 27). En negrita se muestran los *loadings* de mayor peso dentro de cada variable original. En la primera componente principal o CP1 se aprecia mayor peso de las relaciones NG/DFA y NG/EC. Mientras que la CP2 está más correlacionada con la relación DFA/EC. Estas dos componentes explicaban un 83,1% del total de la varianza de los datos.

Tabla 27 *Loadings* de las 3 componentes principales calculadas con las relaciones de áreas de pico de los cromatogramas de los residuos de disparo estudiados.

	CP1	CP2	CP3
NG/DFA	0,95	-0,08	0,31
NG/EC	0,88	0,38	-0,29
DFA/EC	-0,28	0,95	0,14
Proporción de la varianza total	58,0%	35,1%	6,9%

Figura 21 Gráfico biplot del análisis de componentes principales CP1 y CP2 para los residuos de disparo estudiados. a) Variables originales con sus respectivos *loadings* b) las muestras según sus *scores*.



Al ubicar las muestras dentro de las nuevas coordenadas se puede apreciar ciertas características; las municiones etiquetadas como 1 y 17 en la Figura 18(b) correspondientes a los residuos provenientes de la munición 9 mm Luger para pistola se ubican al extremo superior de la gráfica indicando que poseen una mayor relación de DFA/EC. Los residuos de la munición 38 largo Indumil para revólver por solo detectárseles nitroglicerina y difenilamina quedan agrupados muy próximos entre sí en la parte inferior de la gráfica. También se analizó un residuo de disparo proveniente de la munición 5,53 mm Indumil para fusil encontrándose los compuestos nitroglicerina y etilcentralita ubicándose en la gráfica de scores en la parte inferior izquierda. Finalmente, la munición 9 mm Indumil para pistolas produjo residuos que se distribuyeron en dos grupos uno para el lote 63 y otro correspondiente al lote 55.

De lo anterior se puede inferir que la composición de los residuos orgánicos de disparo depende del calibre, lote y fabricante de la munición empleada, más no del tipo de arma empleada.

4.2 ANÁLISIS DE RESIDUOS INORGÁNICOS DE DISPARO POR MEKC-UV

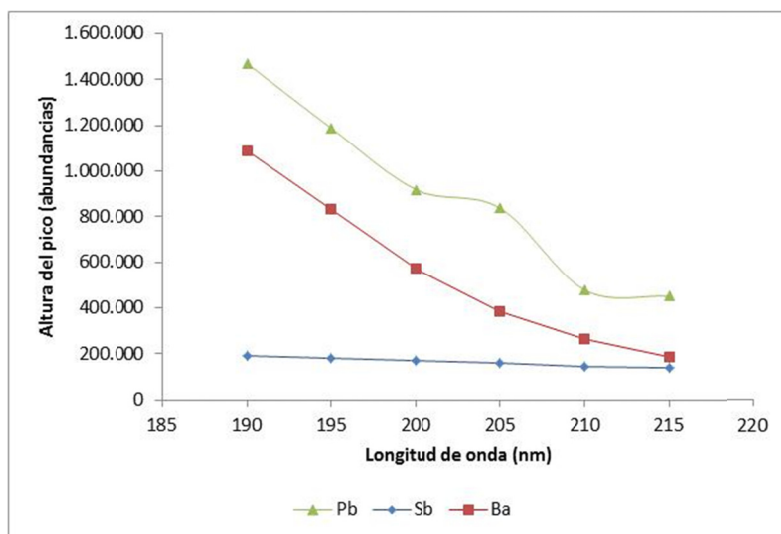
4.2.1 Selección de los parámetros para la separación electroforética

El principio de separación en MEKC es un interesante híbrido entre cromatografía y electroforesis donde ocurre un particionamiento de los analitos entre el buffer acuoso y el núcleo hidrofóbico de las micelas de SDS, pero otros mecanismos de separación electroforética pueden coexistir. Para poder efectuar la separación de los residuos inorgánicos, se seleccionó CDTA como agente complejante para llevar a cabo la complejación pre-capilar, ya que forma complejos aniónicos estables con los metales de interés (plomo, bario y antimonio) y a que previamente se ha reportado como el que ofrece las mejores separaciones de todos los ácidos aminopolicarboxílicos para los elementos lantanoides¹⁵. El objetivo de la etapa de optimización fue seleccionar los valores de los parámetros instrumentales que generen la mejor sensibilidad para cada compuesto con una adecuada resolución.

Inyección de la muestra: Para la inyección de muestra se seleccionó el modo de inyección hidrodinámica. La presión se fijó en 20 "Hg y se fue variando el tiempo desde 0,5 s a 6 s. Se observó que se producía un aumento de las áreas cuando aumentaba el tiempo de inyección; en cambio, en las alturas de los picos se observó que el aumento era gradual hasta llegar a los 3 s, pero a partir de ese tiempo se mantenían. Esto es debido a que la altura es sensible a la sobrecarga de muestra en el capilar mientras que el área no, por lo que, los picos no aumentan tanto su altura como su anchura lo que se refleja en una pérdida de resolución y de eficacia. Por esta razón, se eligió un tiempo de inyección de 3 s.

Longitud de onda: Se evaluaron diferentes longitudes de ondas en el rango de 190 nm a 215 nm, encontrándose que a 190 nm se presentaban las mayores alturas de pico electroforético para los complejos de Pb, Ba y Sb con CDTA (Ver Figura 22)

Figura 22 Variación de la altura del pico cromatográfico con respecto a la longitud de onda.



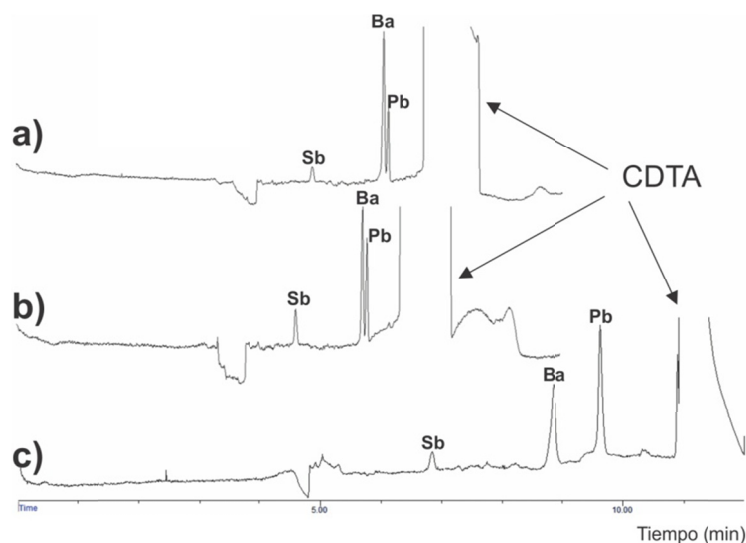
Otro aspecto a considerar es la presencia de varios aditivos en el electrolito ya que estos afectan adversamente la absorbancia de fondo por lo que se constituye en una desventaja para la detección. Por lo tanto, al seleccionar la composición del electrolito se debe tener un balance entre detectabilidad y resolución.

Naturaleza y concentración de la disolución tampón y voltaje aplicado: Los complejos metal-CDTA tienen carga negativa, lo que hace necesario usar condiciones contra electroosmóticas, bajo estas condiciones la solución tampón de borato es el sistema electrolítico más adecuado. La variación de la concentración del buffer en el electrolito junto con el voltaje aplicado son parámetros que sirven para ajustar la separación.

En la Figura 23(a) y Figura 23(b) se observa una leve reducción en los tiempos de migración cuando se cambia la concentración del buffer borato de 20 mM a 40 mM, pero experimentalmente se evidenció un considerable aumento en la corriente, pasando de 24 μ A a 100 μ A, debido a la elevada fortaleza iónica del buffer a 40 mM que ocasiona el calentamiento excesivo del capilar por efecto Joule. En la Figura 23(c) se observa que al

cambiar el voltaje aplicado de +30 KV a +25 KV se da un aumento en los tiempos de migración pero adicionalmente se da un incremento en la resolución entre los picos electroforéticos del plomo y el bario. Por tal motivo se selecciona una concentración de buffer de 20 mM y un voltaje de +20 KV.

Figura 23 Efecto de la variación de la concentración del borato y del voltaje aplicado: a) 20 mM buffer borato y voltaje +30 KV, b) 40 mM buffer borato y voltaje +30 KV, c) 20 mM buffer borato y voltaje +25 KV.



pH: El diagrama de especies para todos los metales con CDTA indica que el rango de pH donde todos los metales forman complejos estables con CDTA, es de 7,5 a 10. A valores de pH inferiores los complejos menos estables (Ba-CDTA) no se forman, mientras que a valores de pH superiores a 10 los complejos con metales trivalentes desaparecen debido a que los complejos metal-hidroxilo $[-(OH)_4]$ se convierten en las especies predominantes, afectando negativamente la detección ultravioleta¹⁵. El pH de la solución tampón de borato se fijó en un valor de 9,2 pues Bernal y Revilla¹⁵ demostraron que este valor provee una óptima capacidad de la solución tampón y previene la formación de los complejos hidroxilo con los metales divalentes.

Concentración de CDTA. Es necesario adicionar una concentración de CDTA 0,5 mM al electrolito para evitar la disociación de los complejos metálicos dentro del capilar. Para obtener mejores límites de detección es aconsejable adicionar la menor cantidad al electrolito de CDTA puesto que también absorbe a la misma longitud de onda de los complejos.

Concentración de SDS: Se seleccionó una concentración 16 mM de SDS superior a la concentración crítica micelar necesaria para la formación de las miscelas.

Tabla 28 Condiciones seleccionadas para la separación de los complejos metal-CDTA por MEKC.

Parámetro	Condiciones
Capilar	100 cm de longitud (78 cm de longitud al detector), 75 μ m de diámetro interno
Electrolito	Borato 20 mM con 16 mM de SDS y 0,5 mM de CDTA
pH	9,2
Temperatura	30 °C
Voltaje de separación	+20 KV
Longitud de onda	190 nm
Disolvente para las muestras	Borato 0,2 mM con 16 mM de SDS y 5 mM de CDTA

Tabla 29 Parámetros indicadores de la calidad del sistema electroforético (n=6).

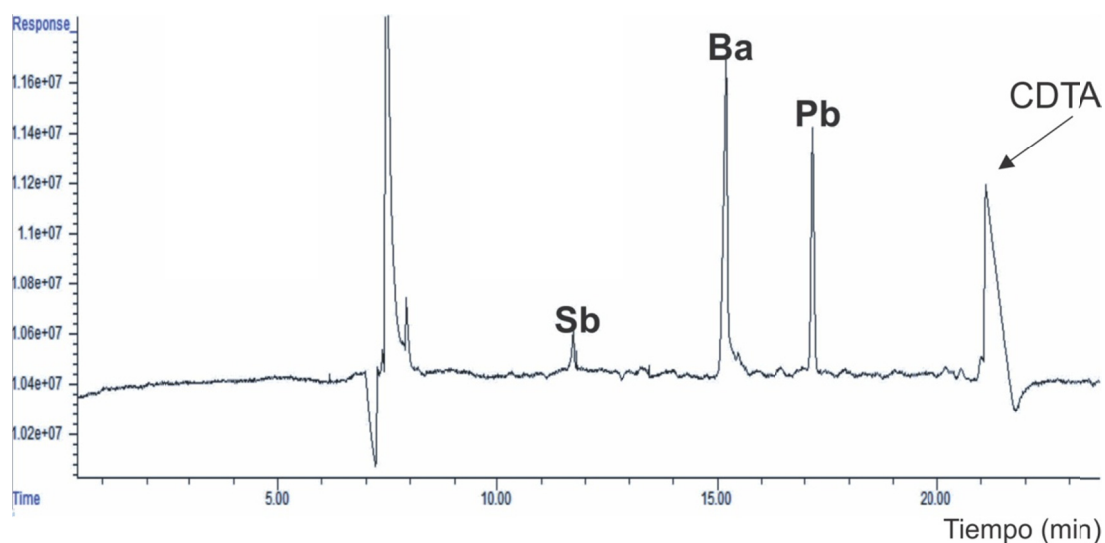
	Tiempo de migración (min)			μ_e ($\times 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$)	k_{MEKC}	N	W	Tailing	Resolución
	t_a	s	CV(%)						
Antimonio	11,608	0,081	0,7	-3,3	1,4	268000	0,053	0,7	-
Bario	14,973	0,173	1,2	-4,6	3,9	148000	0,097	1,3	21,2
Plomo	16,887	0,222	1,3	-5,0	7,6	316000	0,071	1,0	15,9

La movilidad electroforética efectiva, μ_e , fue calculada con la Ecuación 24 (ver ANEXO V). El factor de retención, k_{MEKC} y la resolución en MEKC se estimaron con la Ecuación 25 y la Ecuación 26 del ANEXO V respectivamente.

Para los complejos CDTA-metal con Pb, Ba y Sb los valores obtenidos indican la resolución completa entre ellos.

De los valores de la Tabla 29 se puede apreciar que los coeficientes de variación de los tiempos de retención oscilan entre 0,7 y 1,32, mucho mayores que el valor de 0,02 obtenido por GC/MS para los compuestos orgánicos, lo que indica la menor reproducibilidad de la técnica MEKC, no obstante, son menores que el valor máximo aceptado de un 2%. Se obtuvo un buen número de platos teóricos que osciló entre 148 mil y 316 mil. En la Figura 24 se aprecia el electrocromatograma de los complejos metal-CDTA obtenido bajo las condiciones de la Tabla 28.

Figura 24 Electrocromatograma de los complejos aniónicos metal-CDTA bajos las condiciones seleccionadas.



Bajo las condiciones de separación utilizadas, los límites de detección se estimaron basándose en la inyección hidrodinámica a una presión 20 "Hg durante 3 segundos equivalente a inyectar 31,6 nL. Los límites de detección (definidos como tres veces la relación señal – ruido) fueron de 40 mg/L para el antimonio, 3,1 mg/L para el bario y 0,9 mg/L para el plomo. Evidentemente, la sensibilidad alcanzada para todos los metales no es lo suficiente para su detección en el análisis de residuos de disparo (0,08 $\mu\text{g/L}$ a 10 $\mu\text{g/L}$ para el antimonio, 3,2 $\mu\text{g/L}$ a 12 $\mu\text{g/L}$ para el bario y 0,06 $\mu\text{g/L}$ a 56 $\mu\text{g/L}$ para el

plomo³¹), por lo que se recurrió a la metodología de concentración *on line* denominada *stacking* (ver 3.2.4.1) en la que la inyección hidrodinámica se hizo durante 99,9 s (valor máximo ajustable en el equipo) a 20 "Hg, equivalente a inyectar 1054 nL, luego de la inyección se invirtió la polaridad a -30 KV y se mantuvo durante 6,5 minutos, tiempo requerido para que la corriente del sistema alcanzara un 99% de la corriente inicial, después se ajustaba el voltaje a +25 KV y se dejaba transcurrir normalmente la corrida electroforética, el electrocromatograma obtenido se muestra en la Figura 25.

Figura 25 Electrocromatograma obtenido con pre-concentración *stacking*.

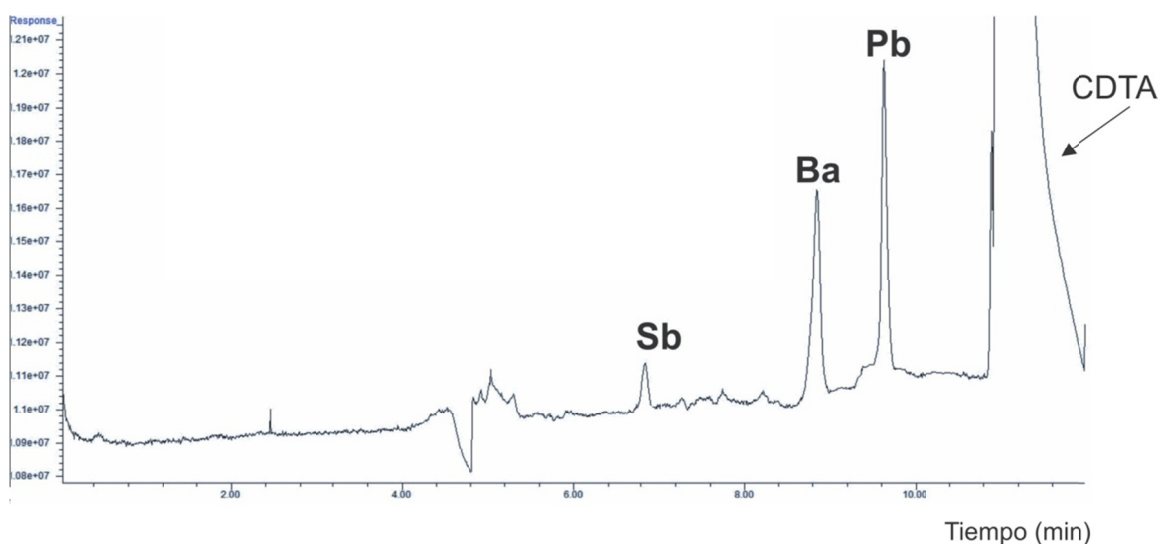


Tabla 30 Parámetros indicadores de calidad del sistema electroforético con *stacking* (n=8).

	Tiempo de migración (min)			μ_e ($\times 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$)	k_{MEKC}	N	W	Tailing	Resolución
	t_a	s	CV(%)						
Antimonio	6,874	0,089	1,3	-3,3	1,1	9000	0,173	1,0	-
Bario	8,862	0,099	1,1	-4,6	4,2	10000	0,221	1,0	5,6
Plomo	9,662	0,100	1,0	-5,0	7,9	20000	0,171	1,0	2,9

De la Tabla 30 se puede observar una considerable disminución del número de platos teóricos con respecto al modo de inyección normal, debido a que el proceso de

focalización de los analitos durante la inversión de la polaridad del voltaje aplicado ocasiona un ensanchamiento de la zona de la muestra. No obstante la pérdida de eficiencia, en la Tabla 31 se observa una mejora en los límites de detección.

Tabla 31 Comparación de los límites de detección obtenidos con inyección normal y preconcentración *stacking*.

	LOD (S/N =3) Modo normal (mg/L)	LOD (S/N =3) <i>Stacking</i> (mg/L)	$F_{stacking}$
Antimonio	40	0,5	19,3
Bario	3	0,07	13,9
Plomo	1	0,05	14,0

Bajo condiciones de inyección normales el volumen inyectado de muestra es de 31,6 nL mientras que con la preconcentración *stacking* es de 1054 nL, lo que indica una inyección de 33,3 veces más de muestra. Este valor es mayor a los reportados en la Tabla 31 para el factor de *stacking* de cada complejo metal-CDTA, pudiéndose atribuir a la pérdida de analito durante el proceso de focalización, al aumento del ruido de la línea base o a la pérdida de eficiencia.

Infortunadamente, aunque se obtuvo incremento en la sensibilidad con la metodología de *stacking*, los límites de detección alcanzados continuaron siendo insuficientes para aplicar esta metodología al análisis de residuos inorgánicos de disparo.

5. CONCLUSIONES

El método optimizado y validado de GC/MS permitió alcanzar límites de detección para la nitroglicerina del orden de los 90 $\mu\text{g/L}$ y de 4 $\mu\text{g/L}$ para la difenilamina y etilcentralita suficientes para detectarlos en muestras reales.

Los compuestos presentes en las manos de los voluntarios, principalmente ácidos grasos, interfirieron en la detección del ftalato de dibutilo un componente común de casi todas las pólvoras de las municiones estudiadas. Afortunadamente, no afectaron la determinación cromatográfica de la nitroglicerina, la difenilamina y la etilcentralita lo que permitió analizar estos componentes en muestras de residuos de disparo.

El proceso de obtención, extracción y preparación de la muestra para el análisis cromatográfico fue simple, lo que facilita su aplicación en análisis rutinarios. Pero debido a que se requieren dos corridas cromatográficas por muestra el tiempo de análisis se incrementa.

Fue posible establecer diferencias entre las pólvoras de las municiones como de los residuos de disparo, pudiendo agruparlos por fabricante de la munición, e incluso, por lote de producción.

La composición de los residuos orgánicos de disparo depende exclusivamente del tipo de munición y no del tipo de arma empleada.

Es factible aplicar la metodología de GC/MS para el análisis de residuos orgánicos de disparo, pero se recomienda ampliar éste estudio abarcando una mayor variedad de fabricantes de munición ya que en éste trabajo se analizaron, casi exclusivamente, residuos de disparo orgánicos originados por munición de la Industria Militar Colombiana, Indumil.

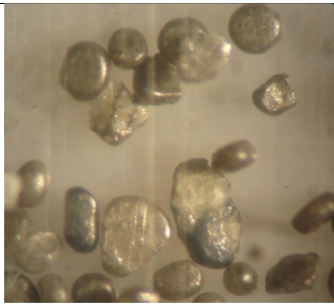
CONCLUSIONES

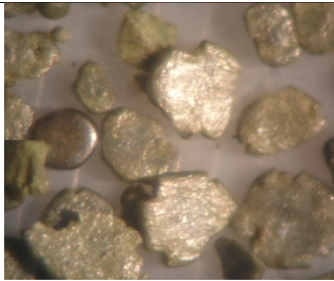
El método de cromatografía electrocinética micelar capilar con detección ultravioleta para el análisis de complejos de plomo, bario y antimonio con CDTA, aunque produjo buenos resultados de selectividad, resolución y valores aceptables de reproducibilidad de los tiempos de retención, falló en alcanzar los límites de detección requeridos para detectar estos tres metales en muestras de residuos de disparo, aun después de aplicar la etapa de preconcentración *on line* por *stacking*.

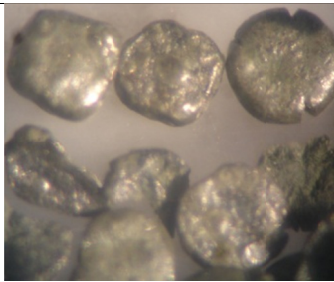
6. ANEXO I

Tipos de pólvora encontrados en algunos cartuchos disponibles comercialmente en Colombia

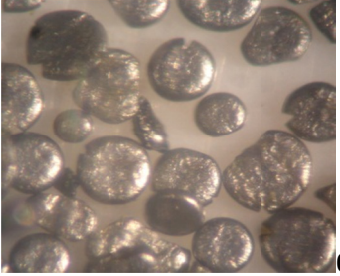
Calibre:	9 mm		1
Fabricante:	Águila		
País:	México		
Peso pólvora (g):	0,352		
Tipo de pólvora:	Regresiva		
Forma:	Disco		
Color:	Gris		

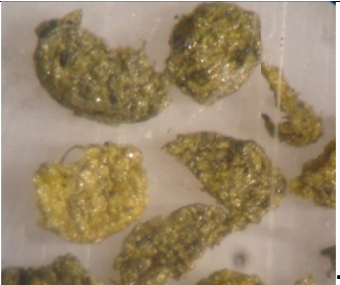
Calibre:	9 mm NATO		2
Fabricante:	Indumil		
País:	Colombia		
Peso pólvora (g):	0,368		
Tipo de pólvora:	Regresiva		
Forma:	Esférica, esférica aplanada, laminar irregular		
Color:	Gris		

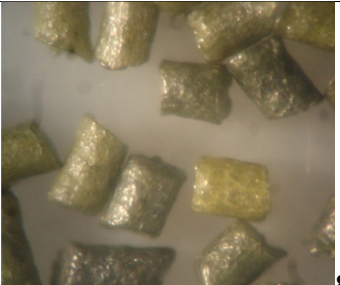
Calibre:	38 largo		3
Fabricante:	Indumil		
País:	Colombia		
Peso pólvora (g):	0,280		
Tipo de pólvora:	Regresiva		
Forma:	Esférica aplanado, laminar irregular		
Color:	Gris		

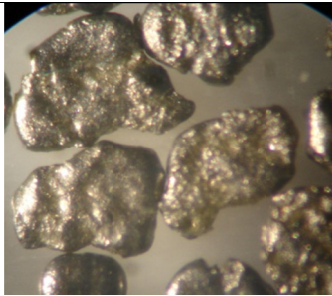
Calibre:	32 largo		4
Fabricante:	Indumil		
País:	Colombia		
Peso pólvora (g):	0,222		
Tipo de pólvora:	Regresiva		
Forma:	Esférica aplanada, laminar irregular		
Color:	Gris		

Calibre:	.22	
Fabricante:	Remington	
País:	USA	
Peso pólvora (g):	0,109	
Tipo de pólvora:	Regresiva	
Forma:	Disco	
Color:	Gris	

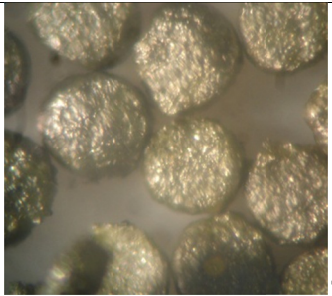
Calibre:	7.65	
Fabricante:	Indumil	
País:	Colombia	
Peso pólvora (g):	0,195	
Tipo de pólvora:	Regresiva	
Forma:	Esférica, esférica aplanada	
Color:	Gris	

Calibre:	7.65	
Fabricante:	Remington Arms	
País:	USA	
Peso pólvora (g):	0,083	
Tipo de pólvora:	Regresiva	
Forma:	Granular irregular	
Color:	Verde	

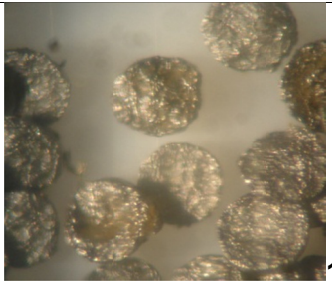
Calibre:	.25 Auto	
Fabricante:	Sellier&Bellot	
País:	República Checa	
Peso pólvora (g):	0,0594	
Tipo de pólvora:	Regresiva	
Forma:	Cilíndrica	
Color:	Verde	

Calibre:	.25 Auto	
Fabricante:	Olin Corp. Win	
País:	USA	
Peso pólvora (g):	0,0524	
Tipo de pólvora:	Regresiva	
Forma:	Granular irregular	
Color:	Gris	

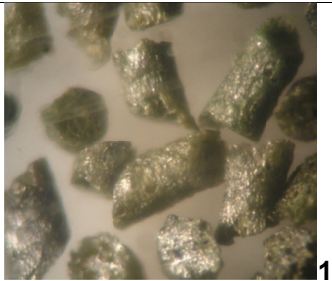
9

Calibre:	.32 corto	
Fabricante:	Companhia Brasileira de cartuchos	
País:	Brasil	
Peso pólvora (g):	0,0399	
Tipo de pólvora:	Regresiva	
Forma:	Disco	
Color:	Gris	

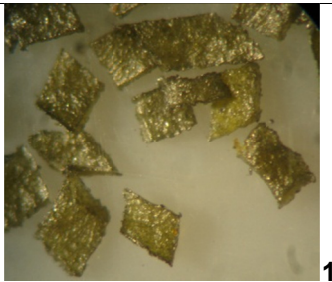
10

Calibre:	.380 Auto	
Fabricante:	Águila – Cartuchos deportivos de México	
País:	México	
Peso pólvora (g):	0,1600	
Tipo de pólvora:	Regresiva	
Forma:	Disco	
Color:	Gris	

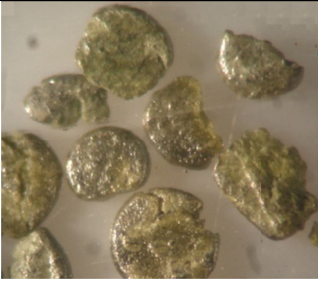
11

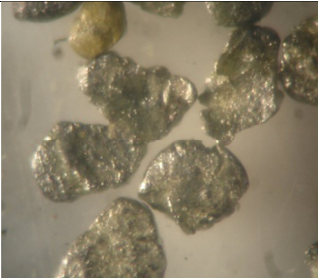
Calibre:	.380 Auto	
Fabricante:	Lapuan Patruunatehdas	
País:	Finlandia	
Peso pólvora (g):	0,2229	
Tipo de pólvora:	Regresiva	
Forma:	Cilíndrica	
Color:	Verde	

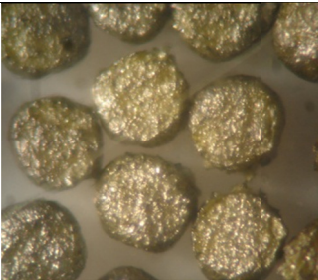
12

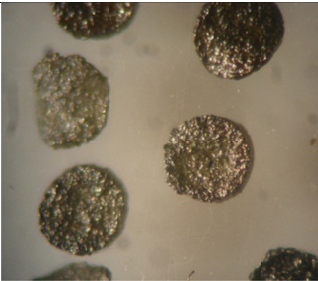
Calibre:	.380 Auto	
Fabricante:	Sellier&Bellot	
País:	República Checa	
Peso pólvora (g):	0,1799	
Tipo de pólvora:	Regresiva	
Forma:	Cuadrilátero laminar	
Color:	Verde	

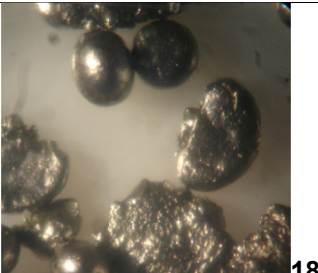
13

Calibre:	.380	
Fabricante:	Recalzado	
País:	-	
Peso pólvora (g):	0,1638	
Tipo de pólvora:	Regresiva	
Forma:	Disco, laminar irregular	
Color:	Gris	14

Calibre:	9 mm	
Fabricante:	Recalzado	
País:	-	
Peso pólvora (g):	0,3331	
Tipo de pólvora:	Regresiva	
Forma:	Laminar irregular	
Color:	Gris	15

Calibre:	.38 corto	
Fabricante:	Remington Arms	
País:	USA	
Peso pólvora (g):	0,1031	
Tipo de pólvora:	Regresiva	
Forma:	Disco	
Color:	Gris	16

Calibre:	9 mm	
Fabricante:	Bermington Arms Company	
País:	USA	
Peso pólvora (g):	0,3213	
Tipo de pólvora:	Regresiva	
Forma:	Disco	
Color:	Gris	17

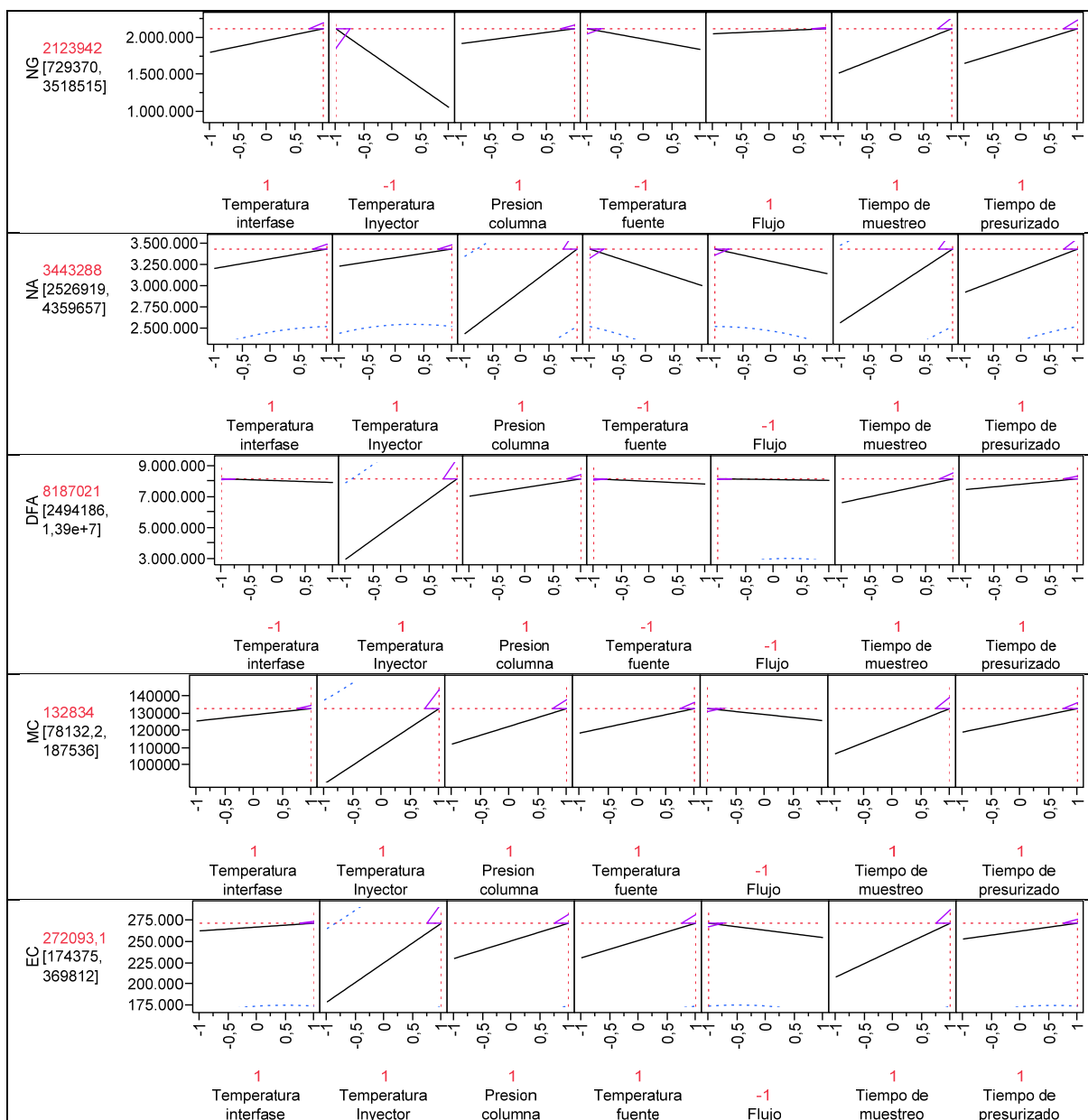
Calibre:	.32 Largo	
Fabricante:	Winchester-Western	
País:	USA	
Peso pólvora (g):	0,1087	
Tipo de pólvora:	Regresiva	
Forma:	Esférica, esférica aplanada, laminar	
Color:	Gris	18

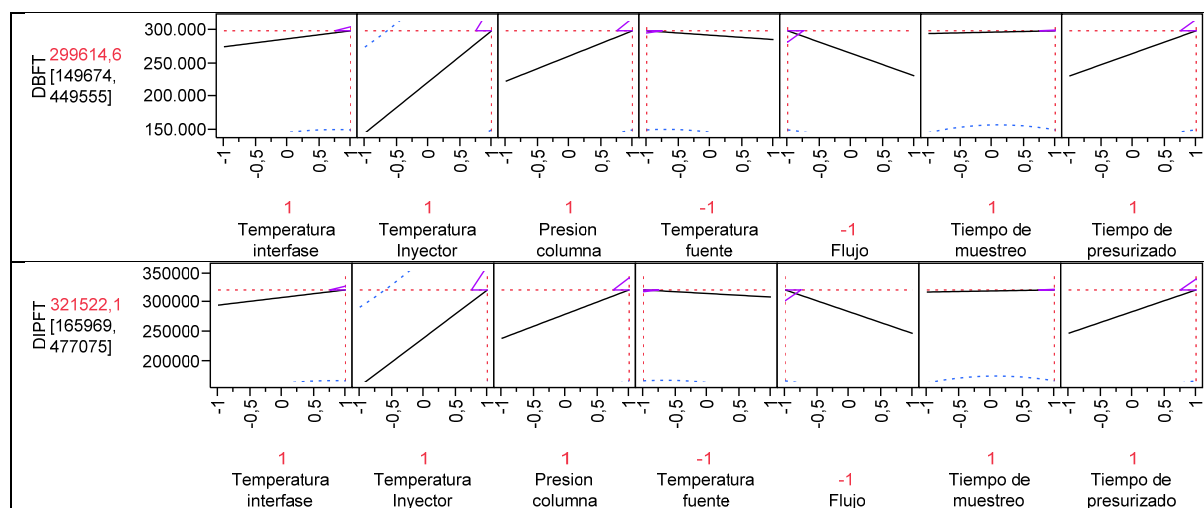
Calibre:	.357 Magnum	
Fabricante:	Hirtenberger Patronen	
País:	Austria	
Peso pólvora (g):	0,8540	
Tipo de pólvora:	Regresiva	
Forma:	Cilíndrica	
Color:	Gris	19

Estereomicroscopio Motic MLC-150C aumento 5.0X.

7. ANEXO II

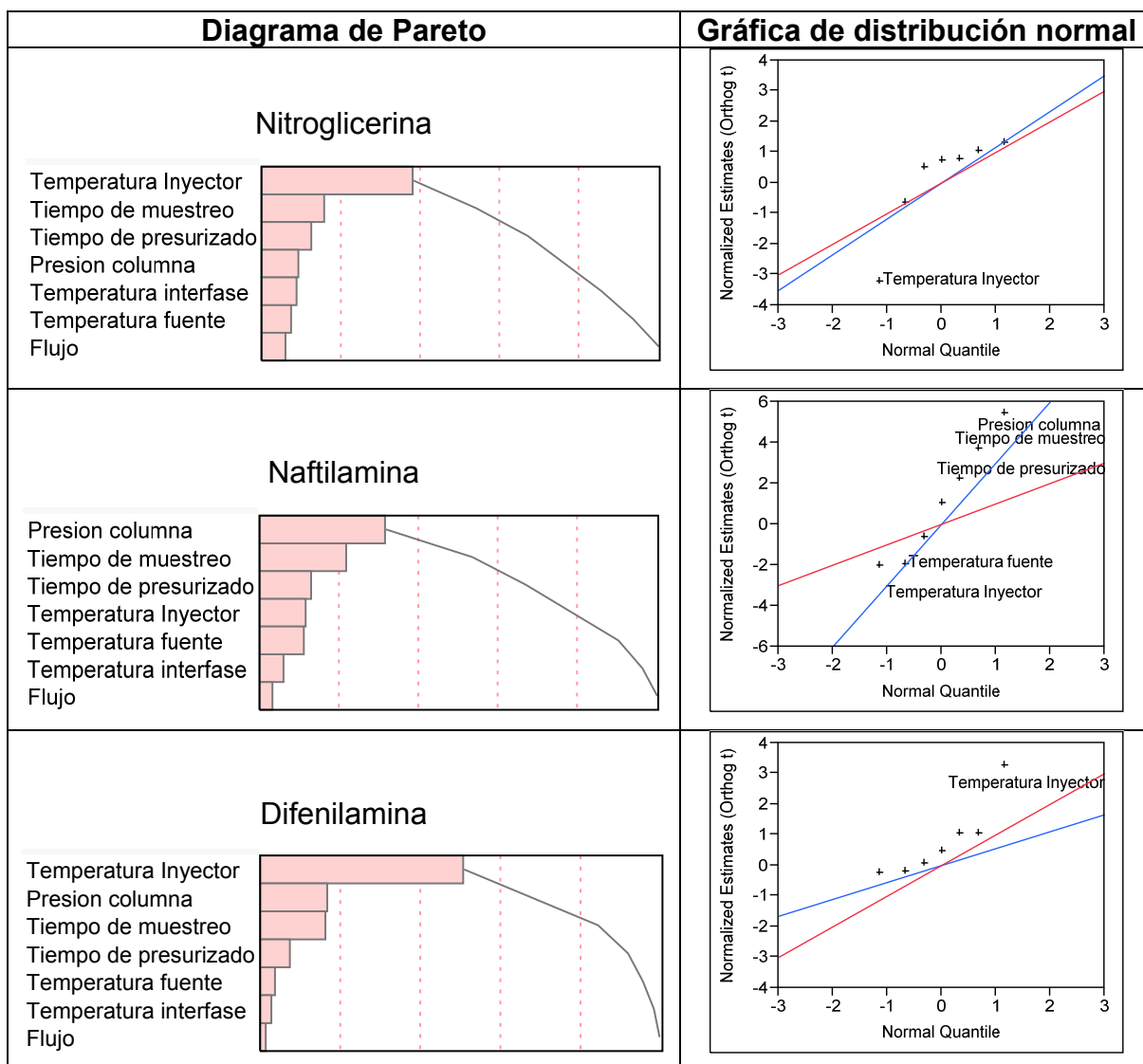
Gráficas de perfiles del diseño factorial de dos niveles con siete factores y como respuesta el área del pico cromatográfico

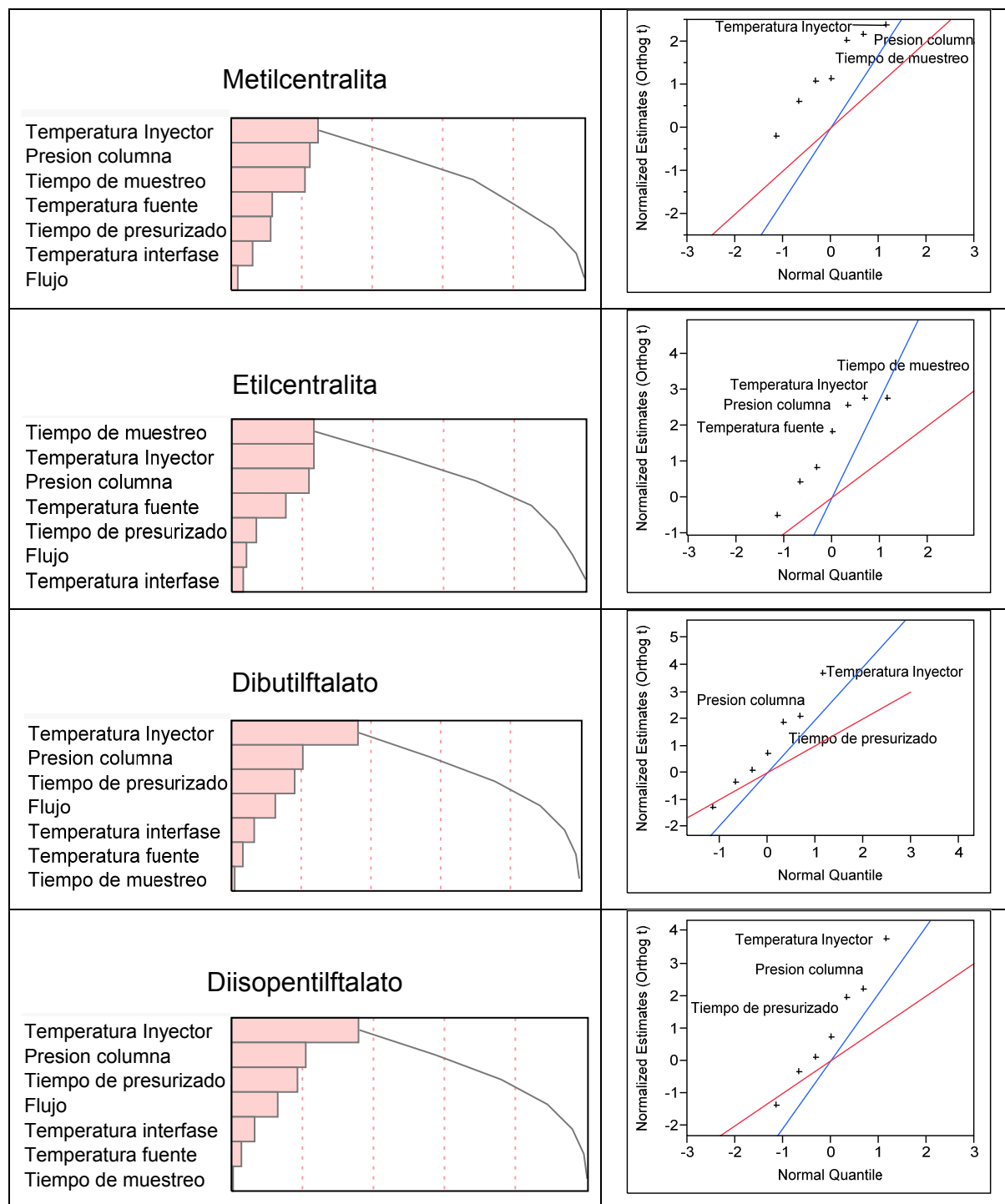




8. ANEXO III

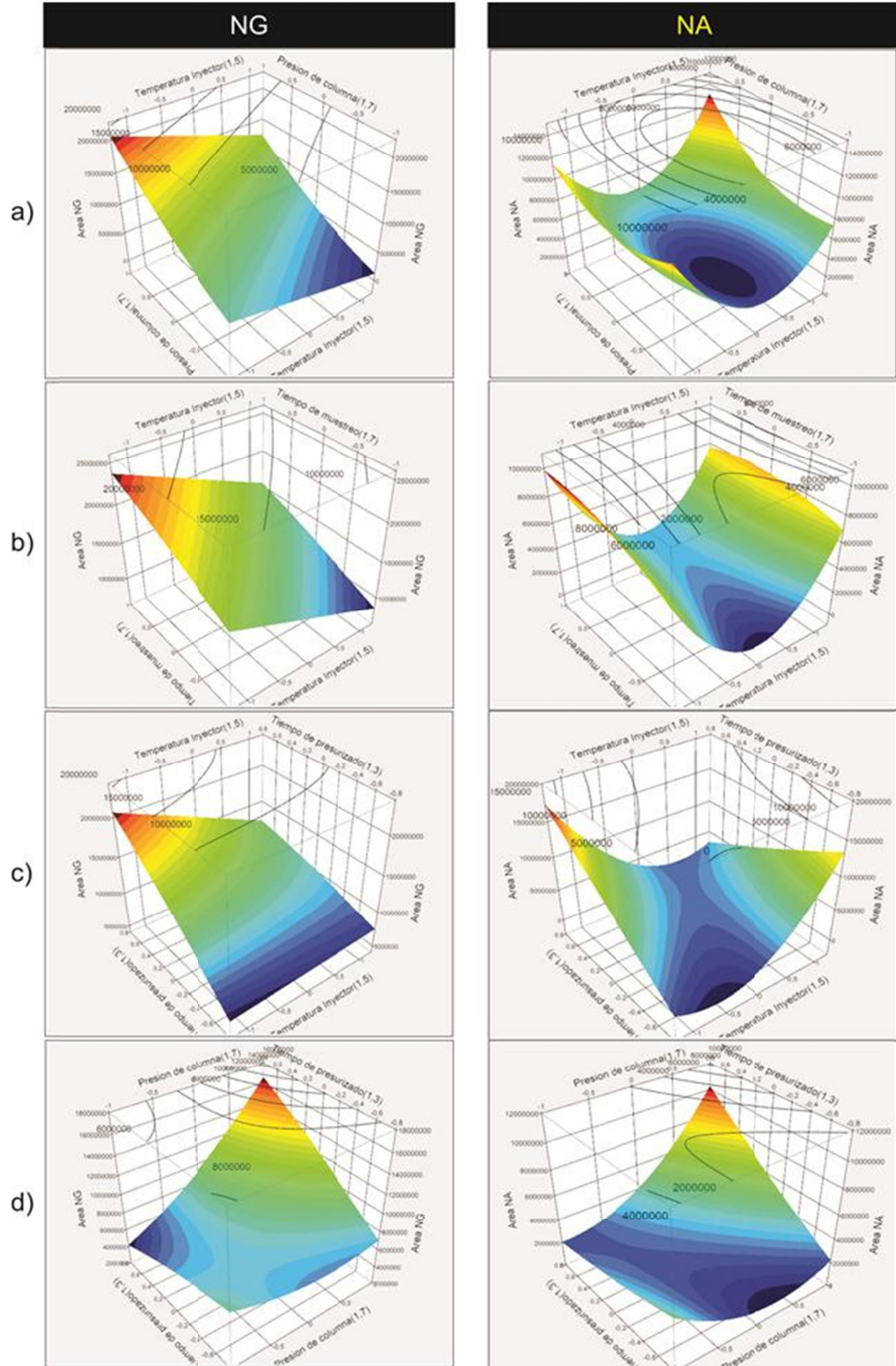
Diagramas de Pareto y gráficas de distribución normal del diseño factorial de dos niveles con siete factores y como respuesta el área del pico cromatográfico

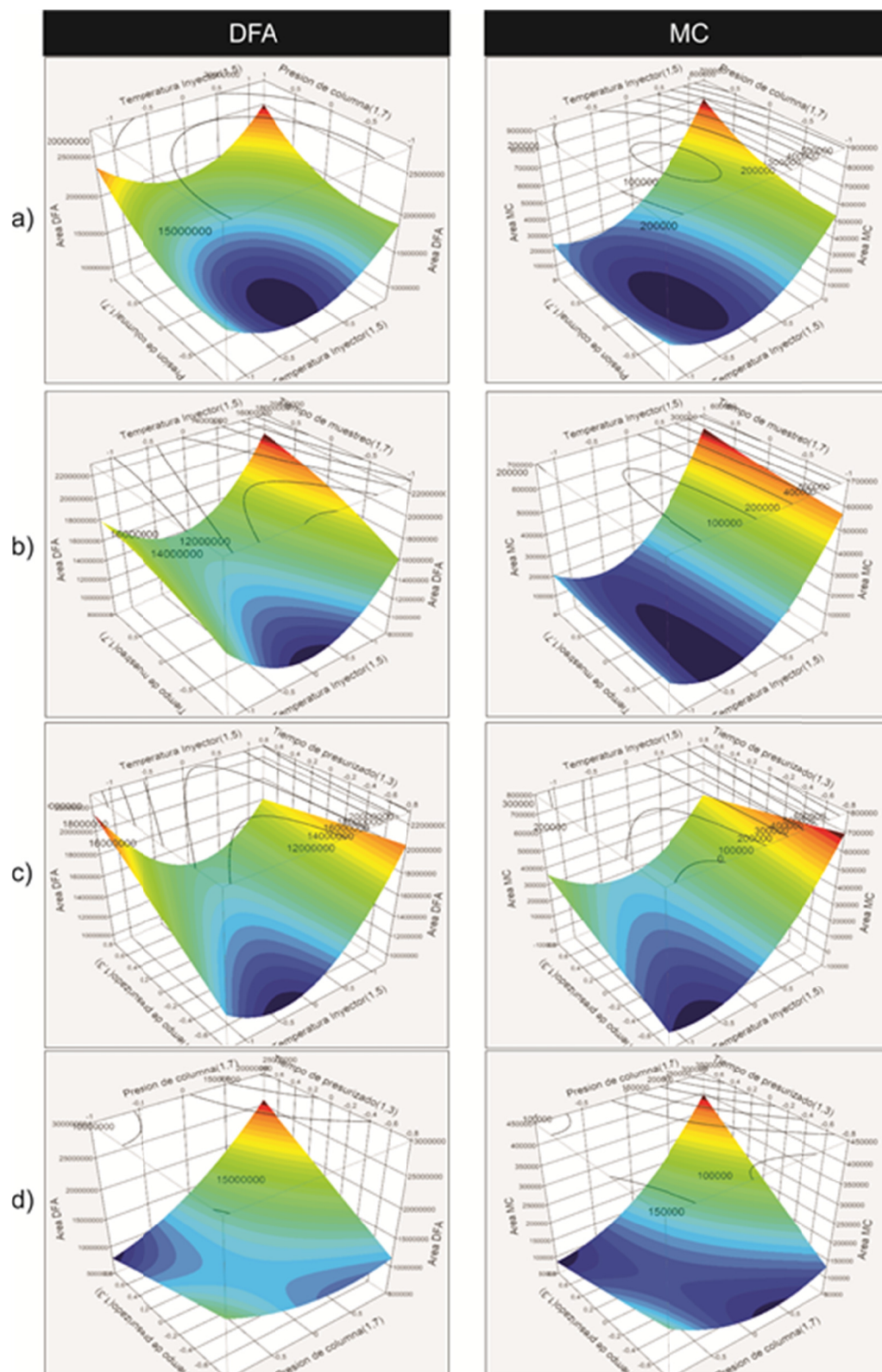


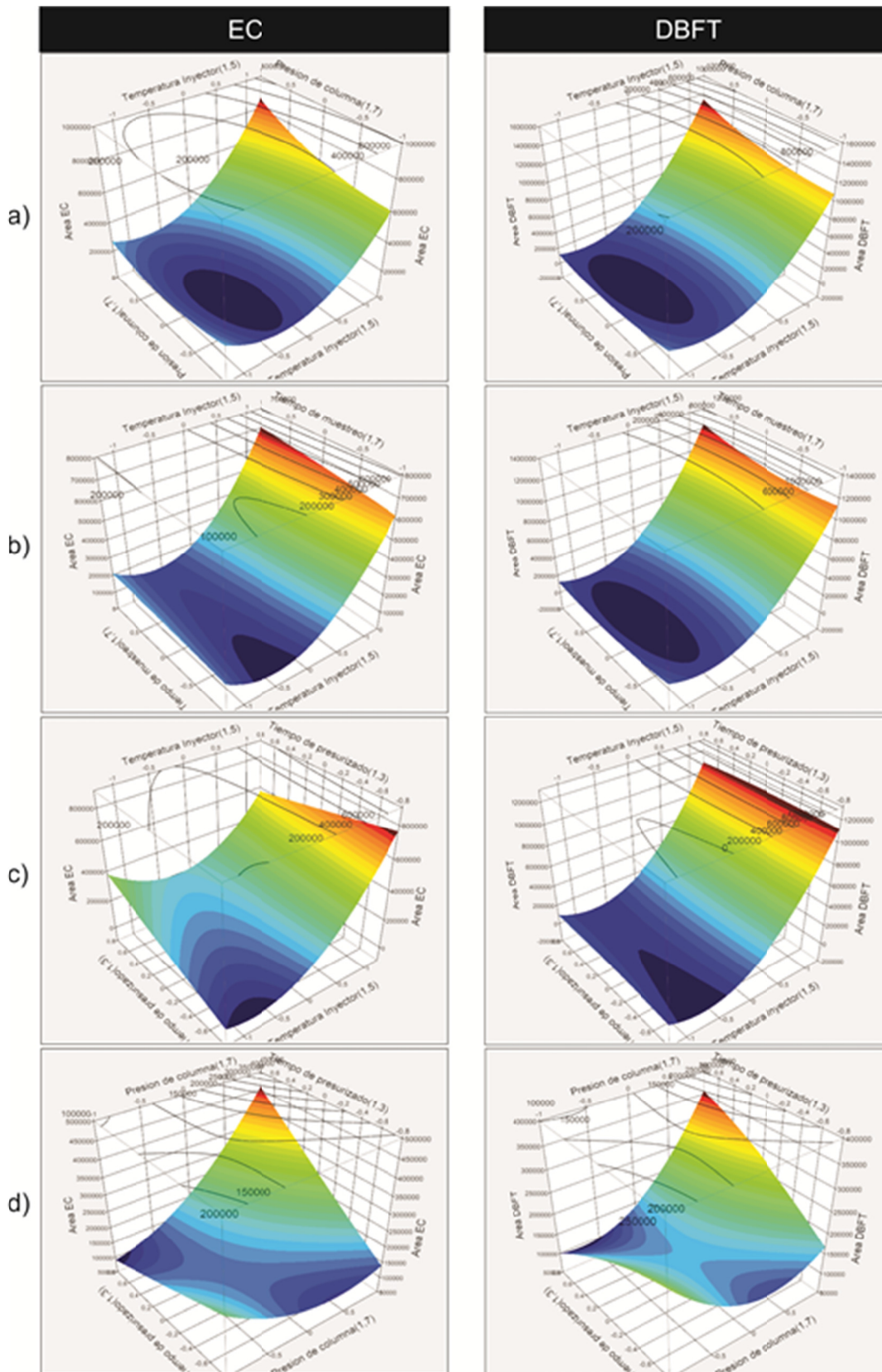


9. ANEXO IV

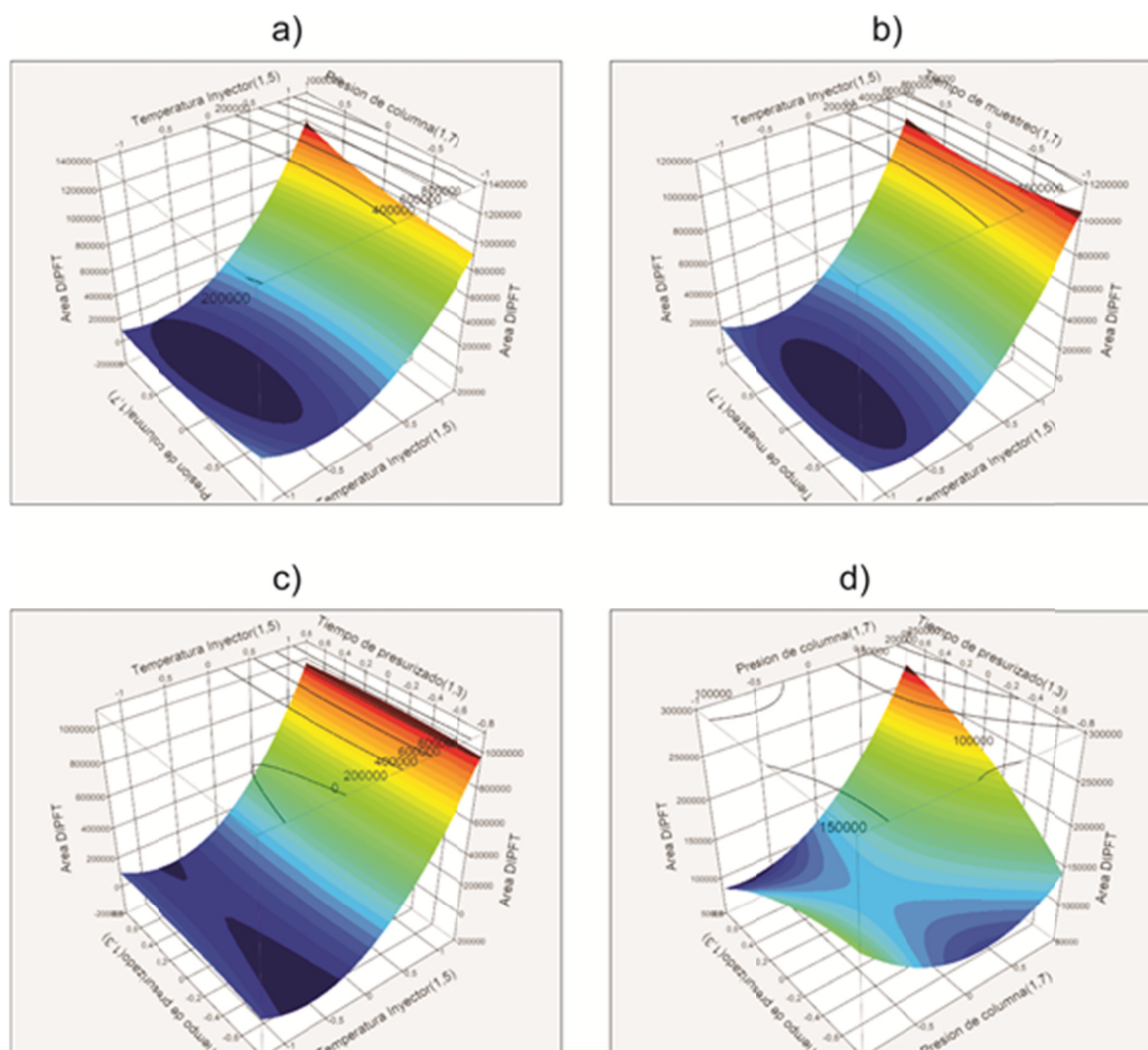
Gráficas de superficie 3D







Gráficas de superficie 3D para el ftalato de diisopentilo



10. ANEXO IV

Validación de métodos de análisis

La validación de un método consiste en confirmar experimentalmente su capacidad de aplicarse satisfactoriamente y que cumple con los requerimientos de un problema analítico específico.

10.1 Parámetros de calidad

La evaluación de la calidad del sistema para los ensayos cromatográficos y electroforéticos por lo general comprende las siguientes etapas:

- Calcular parámetros como: el factor de coileo (*tailing*) de los picos, la resolución, los factores de capacidad, número de platos teóricos, precisión de los tiempos de retención.
- Identificar los límites superior e inferior para cada parámetro mediante el análisis de los valores obtenidos a lo largo de la validación.
- Establecer los criterios de aceptación.

Criterios de aceptación:

- Factor de capacidad $k' \geq 2,0$.
- Factor de coileo (*tailing*) $T \leq 2$.
- Resolución $R \geq 1,5$.
- $N \geq 0,5 N_0$; donde N es el número de platos teóricos de la columna o del capilar y N_0 es el número de platos teóricos de la columna o del capilar cuando estaban nuevos.
- Coeficiente de variación o desviación estándar relativa $\% CV \leq 2,0$.

Para completar la validación de un método de análisis es necesario establecer otros parámetros de calidad del mismo, dentro de los cuales podemos incluir: sensibilidad, selectividad, rango lineal, linealidad, límites de detección y cuantificación.

10.2 Linealidad³²

La linealidad es la capacidad del método para proporcionar resultados que son directamente (o por medio de transformaciones matemáticas) proporcionales a la concentración del analito en la muestra dentro de un rango establecido. Siempre que sea posible se buscará una respuesta de tipo lineal que facilitará su trazado, interpolación e interpretación. Sin embargo, en algunos procedimientos la respuesta del método no suele ser lineal pero sí proporcional a la concentración. En estos casos son válidos otros ajustes matemáticos.

Para evaluar la linealidad es necesario obtener la recta de calibrado a partir de una serie de réplicas de distintos patrones (se recomiendan tres réplicas para al menos cinco valores de concentración equi-espaciados sobre el intervalo de aplicación del método).

El estudio de la linealidad no sólo implica una representación gráfica sino que es necesario realizar una comprobación estadística. Para realizar esta evaluación las fórmulas que se pueden aplicar son las siguientes:

Ecuación de la recta	$y = a + b \cdot x$	Ecuación 1
Estimado \hat{y}_i para x_i	$\hat{y}_i = a + b \cdot x_i$	Ecuación 2
Residual	$e_i = \hat{y}_i - y_i$	Ecuación 3

En la recta de regresión, x es la concentración, y la respuesta, b el valor de la pendiente y, a el término independiente. La pendiente b se encuentra relacionada con la sensibilidad del método de forma que a mayor pendiente mayor sensibilidad (respuesta del método frente a, los cambios de la concentración del analito). El término independiente a , u ordenada en el origen, es la intersección de la recta con el eje de ordenadas y es

indicativo del error sistemático, no difiriendo estadísticamente de cero en caso de no existir sesgo.

La representación de los residuales e_i , calculados según la Ecuación 3, aporta mucha información acerca de la validez del modelo en cuanto que tan cercanos están los valores de y_i experimentales con los valores pronosticados por el modelo, \hat{y}_i . De entre las diversas formas de hacerlo la más habitual consiste en representar los residuales (eje de ordenadas) frente a los valores estimados (eje de abscisas). La distribución de los puntos debería ser aleatoria y no reflejar ninguna tendencia (*homocedasticidad*).

El coeficiente de correlación, r , indica el grado de relación entre la variable x (concentración), y la variable y (respuesta). Su valor máximo es 1. Si r es cercano a la unidad significa que existe correlación con una probabilidad elevada. Un valor nulo indica ausencia de relación lineal entre las variables.

El valor recomendable para el coeficiente de correlación es $\geq 0,999$, aunque en el caso de impurezas se admite $\geq 0,990$. La información obtenida mediante el cálculo de r es limitada y no justifica por si sola la linealidad, siendo r^2 coeficiente de determinación el que aporta una mayor significación estadística ya que expresa la proporción de la variación total de y explicada por el modelo. Adicionalmente, es recomendable realizar un análisis de varianza ANOVA para evaluar la validez del modelo de regresión lineal.

Para poder realizar una ANOVA se deben cumplir los siguientes supuestos:

- *La homogeneidad de variancias*, que se puede comprobar aplicando la prueba de Levene que indicará si el factor concentración tiene alguna influencia en la variabilidad de los resultados. Para probar la homogeneidad de las variancias, se calcula el análisis de varianza en un sentido para Z_{ij} , y del estadístico F_o :

$$F_o = \frac{(n - k) \sum_{i=1}^k n_i (\bar{Z}_j - \bar{\bar{Z}})^2}{(k - 1) \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^{n_i} (Z_i - \bar{Z}_j)^2} \quad \text{Ecuación 4}$$

Donde:

$$Z_{ij} = |y_i - \bar{y}_j|$$

Ecuación 5

Siendo \bar{y}_j la media del grupo j , \bar{Z}_j la media del j -ésimo grupo de los Z_i , \bar{Z} la media global de los Z_i . La prueba de Levene rechaza la hipótesis de que las varianzas son iguales con un nivel de significancia α si $F_o > F_{\alpha, k-1, n-k}$ donde $F_{\alpha, k-1, n-k}$ es el valor crítico superior de la distribución F con $k-1$ grados de libertad y $n-k$ grados de libertad a un nivel de significancia α .

La prueba de Levene ofrece una alternativa más robusta que otros procedimientos, ya que es poco sensible a la desviación de la normalidad. Esto significa que será menos probable que rechace una verdadera hipótesis de igualdad de varianzas sólo porque las distribuciones de las poblaciones muestreadas no son normales³².

Las variancias no deben ser estadísticamente diferentes entre sí para el grado de significación escogido, generalmente α de 0,05.

En caso de que la homogeneidad de variancias no se cumpla, caben dos posibilidades: I. Si se debe a la mayor variabilidad de uno de los extremos del rango, éste se puede acortar siempre y cuando los márgenes de especificaciones lo permitan, o II. Puede plantearse el análisis a otro nivel de concentraciones que favorezca una menor variabilidad³².

- *La normalidad de los residuales* se puede comprobar mediante la representación gráfica que algunos programas estadísticos realizan de los mismos o bien aplicando un test de normalidad.

Una vez comprobados estos supuestos, se calculan los estadísticos F_1 y F_2 (como se indica en la Tabla 32).

Tabla 32 Análisis de la varianza ANOVA.

	Suma de cuadrados (SC)	Grados de libertad (v)	Varianza	
Regresión	$SC_{Reg} = \sum_{i=1}^i (\hat{y}_i - \bar{y})^2$	1	$V_{Reg} = \frac{SC_{Reg}}{v_{Reg}}$	$F_1 = \frac{V_{Reg}}{V_{Res}}$
Residual	$SC_{Res} = \sum_{i=1}^i (y_i - \hat{y}_i)^2$	$\sum_{i=1}^i n_i - 2$	$V_{Res} = \frac{SC_{Res}}{v_{Res}}$	
Falta de ajuste	$SC_{FA} = \sum_{i=1}^i (\hat{y}_i - \bar{y}_j)^2$	$q-2$	$V_{FA} = \frac{SC_{FA}}{v_{FA}}$	$F_2 = \frac{V_{FA}}{V_{EE}}$
Error experimental	$SC_{EE} = \sum_{i=1}^i (y_i - \bar{y}_j)^2$	$\sum_{i=1}^i n_i - q$	$V_{EE} = \frac{SC_{EE}}{v_{EE}}$	
Total	$SC_{Total} = \sum_{i=1}^i (y_i - \bar{y})^2$	$\sum_{i=1}^i n_i - 1$	$V_{Total} = \frac{SC_{Total}}{v_{Total}}$	

y_i : Valor de cada respuesta, \bar{y} : Promedio de todas las respuestas, \bar{y}_j : Promedio de las respuestas de un grupo, \hat{y}_i : Valor estimado utilizando el modelo de regresión lineal.

Fuente: AEFI. Validación de métodos analíticos³².

$F_1 > F_{crítico}$ demuestra la existencia de una pendiente distinta de cero.

$F_2 < F_{crítico}$ demuestra la linealidad entre los resultados obtenidos.

Los valores para F se obtienen de las tablas estadísticas de acuerdo a los grados de libertad correspondientes y a un grado de significación α normalmente igual a 0,05 o mediante el empleo de la función INV.F.CD de Excel versión 14.0.

Otro criterio para comprobar que existe una pendiente significativamente distinta de cero es mediante la aplicación de una prueba t de Student.

$$t_{exp} = \frac{|b|}{s_b} \quad \text{Ecuación 6}$$

Donde s_b es la desviación estándar de la pendiente. La pendiente tiene que ser estadísticamente distinta de cero para un grado de significación α igual a 0,05. También es habitual calcular los intervalos de confianza a partir de la expresión:

$b \pm t \cdot s_b$, siendo en este caso t el valor de la distribución de Student para $n-2$ grados de libertad y un grado de significación α igual a 0,05. Estos intervalos de confianza no deberían incluir el cero.

Un test de proporcionalidad, adicional a F_2 , permite evaluar si la recta pasa por el origen de coordenadas determinando si la variable independiente es significativamente distinta de cero. Habitualmente suele aceptarse que el valor de dicha ordenada sea como máximo el que corresponde a un 1% de la respuesta del analito a valor nominal. Para llevar a cabo este test se recurre como en el caso anterior a una prueba de significación t de Student ($n-2$ grados de libertad, $\alpha=0,05$):

$$t_{exp} = \frac{|a|}{s_a} \quad \text{Ecuación 7}$$

La ordenada en el origen tiene que ser estadísticamente igual a cero para el grado de significación escogido. En los intervalos de confianza ($a \pm t \cdot s_a$) debe estar incluido el cero.

En caso de no cumplirse el test de proporcionalidad sería necesario interpolar el resultado del análisis de cualquier muestra entre al menos dos estándares, uno superior y otro inferior. De esta forma se obvia el sesgo del método.

10.3 Límites de detección y cuantificación (LD y LC)

Las pautas oficiales presentan diferentes enfoques para estimar estos límites, pero dejan al analista en libertad para elegir. Además de la determinación visual, dos de las aproximaciones principales para la determinación del límite de detección y el límite de cuantificación, descritas en la literatura y recomendadas por la comunidad internacional y sistemas de acreditación, son las siguientes:

- *Relación señal – ruido*³³: Es el criterio más utilizado, pero este método sólo puede aplicarse en los sistemas analíticos que presentan ruido de la línea de base. En

técnicas analíticas de separación, tales como las cromatográficas, a menudo la medición del ruido no es trivial y subjetiva. Para determinar la relación señal – ruido, se hace una comparación entre las señales de los componentes de la muestra a concentraciones bajas conocidas, preparadas en la matriz de interés y un “*blanco*” o una muestra libre de componentes preparada en la misma matriz. La relación señal – ruido puede ser 3:1 o 2:1 para el límite de detección y 10:1 para el límite de cuantificación.

- *Desviación estándar de la respuesta*³³: Esta metodología consiste en calcular los límites de detección y cuantificación a partir de la desviación estándar de la respuesta (s) y la pendiente de la curva de calibración (b).

$$LD = \frac{3,3 * (s)}{b} \quad \text{Ecuación 8}$$

$$LC = \frac{10 * (s)}{b} \quad \text{Ecuación 9}$$

La desviación estándar de la respuesta se puede determinar basándose en la desviación estándar de la curva de calibración ($s_{y/x}$) o en la desviación estándar del intercepto con el eje de las y de la curva de calibración (s_a). Para obtener estos valores se debe construir una curva de calibración del analito en la matriz de interés con concentraciones cercanas al límite de detección esperado.

10.4 Evaluación de la exactitud

La exactitud se define por la norma NTC 3529-1 como: “*Cercanía del acuerdo entre un resultado de ensayo y el valor de referencia aceptado*”³⁴. La exactitud combina dos propiedades complementarias: la precisión y la veracidad de los resultados. La veracidad se logra al eliminar los errores sistemáticos, mientras que la mejor precisión se obtiene al minimizar los errores aleatorios.

La precisión es *la cercanía del acuerdo entre resultados de ensayo independientes obtenidos en condiciones estipuladas*³⁴. La expresión “*resultados de ensayo independientes*” significa resultados obtenidos en tal forma que en cada resultado no influye ningún resultado anterior del mismo objeto de ensayo o de uno similar. Las medidas cuantitativas de la precisión dependen críticamente de las condiciones estipuladas. Las condiciones de repetibilidad y reproducibilidad son ajustes particulares de las condiciones extremas.

La precisión depende solamente de la distribución de los errores aleatorios y no se relaciona con el valor verdadero o el valor especificado. La medida de la precisión se suele expresar en términos de imprecisión y se calcula como una desviación estándar de los resultados de ensayo. Cuanta menos precisión haya, mayor será la desviación estándar.

La precisión se puede calcular en *condiciones de repetibilidad* a partir de la desviación estándar de la repetibilidad σ_r , o s_r , esto es, de medidas realizadas en las mismas condiciones experimentales, en el mismo laboratorio, con el mismo operador, usando el mismo equipo y en un corto intervalo de tiempo.

La *reproducibilidad* a partir de la desviación estándar de la reproducibilidad σ_R , o s_R donde las medidas se realizan con el mismo método pero en diferentes laboratorios, con diferentes operadores, equipos, y distintos intervalos de tiempo.

Puede estimarse también la precisión en situación intermedia, es decir, debida a cambios en las condiciones de observación (tiempo, calibración, operador y equipo) dentro de un laboratorio. A este parámetro se le denomina, *precisión intermedia*.

En condiciones de *repetibilidad*, todos los cuatro factores se encuentran en la condición 1 de la Tabla 33. Para condiciones de *precisión intermedia*, uno o más factores se encuentran en la condición 2 de la Tabla 33 y se especifican como “condiciones de precisión con M factor(es) diferentes”, en donde M es el número de factores en la condición 2. En condiciones de *reproducibilidad*, los resultados se obtienen en diferentes

laboratorios, de manera que no solamente se encuentran los cuatro factores en la condición 2, sino que también hay efectos adicionales debidos a las diferencias entre laboratorios en lo referente a la administración y mantenimiento de los laboratorios, los niveles de entrenamiento generales de los operadores y la estabilidad en la verificación en los resultados de los ensayos, etc.

Tabla 33 Cuatro factores importantes y sus condiciones.

Factor	Condiciones de medición dentro del laboratorio	
	Condición 1 (igual)	Condición 2 (diferente)
Tiempo (T)	Mediciones hechas al mismo tiempo	Mediciones hechas en momentos diferentes
Calibración (C)	No hay calibración entre mediciones	Calibración llevada a cabo entre mediciones
Operador (O)	El mismo operador	Diferentes operadores
Equipo (E)	El mismo equipo	Diferente equipo

Fuente: ISO 5725-4:2007 (NTC 3529-4)³⁵.

Bajo condiciones de *precisión intermedia*, con M factor(es) diferentes, es necesario especificar qué factores se encuentran en la condición 2 de la Tabla 33, por medio de sufijos, por ejemplo:

- Desviación estándar de precisión intermedia con tiempo diferente, $s_{I(T)}$;
- Desviación estándar de precisión intermedia con calibración diferente, $s_{I(C)}$;
- Desviación estándar de precisión intermedia con operador diferente, $s_{I(O)}$;
- Desviación estándar de precisión intermedia con tiempo y operador diferente, $s_{I(TO)}$;
- Desviación estándar de precisión intermedia con tiempo, operador y equipo diferente, $s_{I(TOE)}$;
- Y muchos otros en forma similar.

Los parámetros interesantes para un método de rutina de laboratorio son la media a largo plazo, $\bar{\bar{y}}$, la precisión en condiciones de repetibilidad (expresada como desviación estándar de repetibilidad σ_r) y la precisión intermedia (expresada como desviación estándar de precisión intermedia para tiempos diferentes, $\sigma_{I(T)}$). Para estimar estos parámetros, el laboratorio debe realizar un pseudo-programa de ensayos interlaboratorios,

reemplazando los laboratorios participantes por “tiempos” (véase NTC 3529-2 (ISO 5725-2)³⁶). El modelo matemático utilizado para representar este pseudo-programa de ensayo interlaboratorios es el mismo que el utilizado para un programa interlaboratorios, reemplazando el subíndice L por T (laboratorio por tiempo). En este caso, la variabilidad “por tiempo diferente” incluye la variación debida a los diferentes cambios que tienen lugar habitualmente en el laboratorio, tales como calibración del equipamiento, distintos reactivos, diferentes analistas, condiciones ambientales, etc. Es conveniente que el pseudo-programa interlaboratorios cubra el periodo de tiempo que normalmente engloba a todos estos cambios.

Para el nivel j , la media general es:

$$\bar{y} = \frac{\sum_{i=1}^p n_{ij} \bar{y}_{ij}}{\sum_{i=1}^p n_{ij}} \quad \text{Ecuación 10}$$

Tres varianzas son calculadas para cada nivel. Ellas son la varianza de repetibilidad, la varianza entre tiempos y la varianza de precisión intermedia.

La varianza de repetibilidad es:

$$s_{rj}^2 = \frac{\sum_{i=1}^p (n_{ij} - 1) s_{ij}^2}{\sum_{i=1}^p (n_{ij} - 1)} \quad \text{Ecuación 11}$$

La varianza entre factores es:

$$s_{tj}^2 = \frac{s_{dj}^2 - s_{rj}^2}{\bar{n}_j} \quad \text{Ecuación 12}$$

En donde

$$s_{dj}^2 = \frac{1}{p-1} \sum_{i=1}^p n_{ij} (\bar{y}_{ij} - \bar{y}_j)^2 = \frac{1}{p-1} \left[\sum_{i=1}^p n_{ij} (\bar{y}_j)^2 - (\bar{y}_j)^2 \sum_{i=1}^p n_{ij} \right] \quad \text{Ecuación 13}$$

Y

$$\bar{n}_j = \frac{1}{p-1} \left[\sum_{i=1}^p n_{ij} - \frac{\sum_{i=1}^p n_{ij}^2}{\sum_{i=1}^p n_{ij}} \right] \quad \text{Ecuación 14}$$

La varianza de precisión intermedia es:

$$s_{Ij(T)}^2 = s_{rj}^2 + s_{tj}^2 \quad \text{Ecuación 15}$$

La veracidad se define como: “*cercanía del acuerdo entre el valor promedio obtenido a partir de una gran serie de resultados de ensayo y un valor de referencia aceptado*”³⁴. La evaluación de la veracidad consiste en estimar la concentración media del analito en una muestra y compararla con el valor verdadero empleando el protocolo estadístico apropiado. Ya que es imposible conocer el valor verdadero de una especie química en una muestra, es necesario obtener un valor verdadero convencional o aceptado para emplearlo como valor de referencia. Este último puede ser obtenido mediante dos estrategias: empleando un estudio interlaboratorio o un estudio intralaboratorio.

Existen dos medidas de la veracidad. Ambas se contemplan en la NTC 3529-4³⁵.

- a) *Sesgo del método de medición* (δ): cuando existe una posibilidad de que el método de medición pueda dar lugar a un sesgo, manteniéndose éste en cualquier lugar y tiempo en que se realice la medición, esto requiere un experimento en el que participen muchos laboratorios, tal como se describe en la NTC 3529-2 (ISO 5725-2)³⁶.
- b) *Sesgo del laboratorio* (Δ): mediciones realizadas dentro de un laboratorio pueden poner de manifiesto un “*sesgo de laboratorio*” definido como la diferencia entre la expectativa de los resultados de ensayo procedentes de un laboratorio en particular y un valor de referencia aceptado³⁴. Si se decide realizar un experimento para estimar el sesgo del laboratorio, debe tenerse en cuenta que el valor estimado será válido únicamente en el momento del experimento. Si se trata de demostrar que el sesgo del laboratorio no varía, es necesario otro tipo de ensayo; el método descrito en la NTC 3529-6 (ISO 5725-6)³⁷ puede ser utilizado a tal efecto.

Dentro de un laboratorio están disponibles dos alternativas para demostrar la veracidad de un método analítico: el uso de materiales de referencia y la comparación con métodos de referencia.

Para verificar la veracidad utilizando un material de referencia, se determina la media y la desviación estándar de una serie de réplicas de una prueba y se compara contra el valor caracterizado del material de referencia. El material de referencia ideal sería un material de referencia certificado de matriz natural, muy semejante a las muestras de interés. Claramente la disponibilidad de estos materiales es limitada. Los materiales de referencia para una validación pueden ser por consiguiente:

- Preparados por adición de materiales típicos con materiales de referencia de pureza certificada u otros materiales de pureza y estabilidad adecuadas.
- Materiales típicos bien caracterizados, de estabilidad verificada internamente y conservados para control de calidad interno³⁸.

El sesgo puede determinarse aplicando cada método a un material de referencia certificado, donde μ será el valor aceptado del material de referencia.

$$\hat{\Delta} = \bar{\bar{y}} - \mu \quad \text{Ecuación 16}$$

Un intervalo de confianza de aproximadamente el 95 % para el sesgo del laboratorio se obtiene por medio de:

$$\hat{\Delta} - A\sigma_{I(T)} \leq \hat{\Delta} \leq \hat{\Delta} + A\sigma_{I(T)} \quad \text{Ecuación 17}$$

En donde A viene dado por:

$$A = 1,96 \sqrt{\frac{n(\gamma^2 - 1) + 1}{\gamma^2}} \quad \text{Ecuación 18}$$

Si $\sigma_{I(T)}$ se desconoce, debe emplearse en su lugar su estimador $s_{I(T)}$, calculándose A con un valor de:

$$\gamma = \frac{\sigma_{I(T)}}{\sigma_r} \quad \text{Ecuación 19}$$

Si

$$|\bar{y} - \mu| \leq \frac{2\sqrt{s_t^2 + \frac{s_r^2}{n}}}{p_t} \quad \text{Ecuación 20}$$

Se considera que la diferencia entre la media a largo plazo y el valor aceptado no es estadísticamente significativa.

En el caso de existir un sesgo detectable, se introduce otro criterio de aceptación, que es:

$$|\bar{y} - \mu| > \frac{\Delta_m}{2} \quad \text{Ecuación 21}$$

11. ANEXO V

Ecuaciones empleadas

Ecuaciones para la codificación de niveles:

$$y = \frac{2x - (x_{max} + x_{min})}{(x_{max} - x_{min})} \quad \text{Ecuación 22}$$

$$x = \frac{y(x_{max} - x_{min}) + (x_{max} + x_{min})}{2} \quad \text{Ecuación 23}$$

Donde x es el valor en las unidades reales, y el valor codificado, x_{max} y x_{min} el valor del nivel alto y bajo, respectivamente, en unidades reales.

Movilidad electroforética efectiva, μ_e en $\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$:

$$\mu_e = \frac{l \cdot L}{t_a V} - \frac{l \cdot L}{t_0 V} \quad \text{Ecuación 24}$$

Donde l y L son la longitud del capilar al detector y la longitud total del capilar en centímetros, respectivamente, V es el voltaje aplicado en voltios, t_a es el tiempo de migración del anión y t_0 el tiempo de migración del marcador neutral.

Factor de retención en cromatografía electrocinética micelar, k_{MEKC} :

No es exactamente el factor de retención cromatográfico, ya que en MEKC la *pseudo fase estacionaria* se encuentra en movimiento, y puede estimarse como:

$$k_{CEMC} = \frac{t_a - t_0}{t_0 \left(1 - \frac{t_a}{t_{mc}}\right)} \quad \text{Ecuación 25}$$

t_{mc} es el tiempo de migración de la micela³⁹.

Resolución en MEKC⁴⁰:

$$R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} \cdot \frac{\left(\frac{\alpha-1}{\alpha}\right) \cdot \left(\frac{k_2}{1+k_2}\right) \cdot \left(1 - \frac{t_0}{t_{mc}}\right)}{\left(1 + \frac{t_0 \cdot k_1}{t_{mc}}\right)} \quad \text{Ecuación 26}$$

Donde se observa que la resolución es función del número de platos teóricos (N), del factor de separación (α) y los factores de capacidad de los analitos

Factor de stacking, $F_{stacking}$. Mide el incremento en el área de pico debido al proceso de *stacking* se calcula como:

$$F_{stacking} = \frac{S_c}{S_{c(Normal)}} \times \frac{C_{iny(Normal)}}{C_{iny}} \quad \text{Ecuación 27}$$

Donde C_{iny} corresponde a la concentración inyectada bajo condiciones de *stacking*, $C_{iny(Normal)}$ a la concentración inyectada bajo condiciones normales de inyección hidrodinámica. S_c y $S_{c(normal)}$ son las áreas corregidas del pico electroforético bajo condiciones de *stacking* y de inyección normal respectivamente.

Como en la electroforesis capilar con detección ultravioleta, las áreas de los picos dependen de la velocidad aparente de los analitos que migran, éstas son corregidas por los tiempos de migración de los picos, de acuerdo a:

$$S_c = \frac{S}{t_a} \quad \text{Ecuación 28}$$

Donde S_c es el área de pico corregida, S el área de pico medida y t_a el tiempo de migración del analito de interés.

BIBLIOGRAFÍA

- 1 2011 Global study on homicide: Trends, contexts, data. United Nations Office on Drugs and Crime (UNODC). Vienna, 2011, 125 p.
- 2 Observatorio Social, Boletín informativo Nro. 12. Santiago de Cali, 2011, 12 p.
- 3 Meng, H. y Caddy, B. Gunshot Residue Analysis—A review. *J. Forensic Sci.* 1997, 42, 553-572.
- 4 Special Report, evidence under suspicion [en línea]. Baltimore: Baltimore Sun, junio 2005 [citado en 01 de mayo de 2012]: disponible en internet: <<http://truthinjustice.org/gunshot-residue.htm>>
- 5 Dalby, O. *et al.* J. Analysis of Gunshot Residue and Associated Materials—A Review. *J. Forensic Sci.* 2010, Vol. 55, No. 4, 924-943.
- 6 SCHWOEBLE, A. J. y EXLINE, D. Current Methods In Forensic Gunshot Residue Analysis. Boca Raton: CRC Press LLC, 2000. p. 12–54.
- 7 Basu S. Formation of gunshot residues. *J Forensic Sci.* 1982; 27(1):72–91.
- 8 ASTM Standard E1588-10e1, 2010, “Standard Guide for Gunshot Residue Analysis by Scanning Electron Microscopy/ Energy Dispersive X-ray Spectrometry” ASTM International, West Conshohocken, PA, 2010, DOI: 10.1520/E1588-10E01.
- 9 FEIGL, F and ANGER, V. Pruebas a la gota en análisis inorgánico. México: Editorial el Manual Moderno, 1980. p. 383, 387.

-
- 10 MEYERS, R. A. Encyclopedia of Analytical Chemistry, *Spot Test Analysis*. John Wiley & Sons, 2011. p. 14.
 - 11 Nitrite Residues [en línea]. Washington, DC: National Institute of Justice, [citado en 01 de mayo de 2012]: disponible en internet: <http://www.nij.gov/training/firearms-training/module12/fir_m12_t06_03.htm>
 - 12 Ruch, R. R. *et al.* Neutron Activation Analysis in Scientific Crime Detection. *J. Forensic Sci.* 1964, 9, 119-132.
 - 13 Romolo, F. S. y Margot P. Identification of Gunshot Residue: A Critical Review. *Forensic Science International*. 2001, 119, 195-211.
 - 14 Meng, H. H. y Caddy, B. Gunshot Residue Analysis—A review. *J. Forensic Sci.* 1997, 42, 553-572.
 - 15 Bernal E. y Revilla, A. Simultaneous Determination of Inorganic and Organic gunshot Residues by Capillary Electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 2004, 1061, 225-233.
 - 16 Hu, Q. *et al.* Determination of Trace Lead, Cadmium and Mercury by On-line Column Enrichment Followed by RP-HPLC as Metal-tetra-(4-bromophenyl)-porphyrin Chelates. *Talanta*, 2002, 57, 751-756.
 - 17 Kaur, V. *et al.* A new Approach for Simultaneous Determination of Co(II), Ni(II), Cu(II) and Pd(II) Using 2-thiophenalddehyde-3-thiosemicarbazone as Reagent by Solid Phase Microextraction–high Performance Liquid Chromatography. *Analytica Chimica Acta*, 2007, 603, 44–50.

-
- 18 MacCrehan, W. *et al.* Investigating the Effect of Changing Ammunition on the Composition of Organic Additives in Gunshot Residue (OGSR). *J. Forensic Sci.* 2000, 46, 57-62.
- 19 Wilson, J. *et al.* Time Since Discharge of Shotgun Shells. *J. Forensic Sci.* 2003, 48, 1-4.
- 20 Muller, D. *et al.* A Novel Method for the Analysis of Discharged Smokeless Powder Residues. *J. Forensic Sci.* 2007, 52, 75-78.
- 21 Weyermann, C. *et al.* Analysis of organic volatile residues in 9 mm spent cartridges. *Forensic Science International.* 2009, 186, 29-35.
- 22 De Gregori, C. *et al.* Speciation analysis of antimony in marine biota by HPLC-(UV)-HG-AFS: Extraction procedures and stability of antimony species. *Talanta.* 2007, 73, 458–465.
- 23 Yukitoki, M. *et al.* Study on simultaneous speciation of arsenic and antimony by HPLC–ICP-MS. *Talanta.* 2007, 73, 81-86.
- 24 Gómez, J. E. y Sandoval, J. E. *Electrophoresis.* 2008, 29, 381–392.
- 25 J.P. Quirino y S. Terabe. On-line concentration of neutral analytes for micellar electrokinetic chromatography. *J. Chromatogr. A.* 1997, 791, 255 –267.
- 26 Kirkbride, K. *et al.* Application of solid-phase microextraction to the recovery of organic explosives. *J Forensic Sci.* 1998, 43(1), 76–81.
- 27 MacCrehan W. *et al.* Investigating the effect of changing ammunition on the composition of organic additives in gunshot residue (OGSR). *J Forensic Sci.* 2001, 46(1), 57–62.

- 28 HANRAHAN, G. y GOMEZ, F. Chemometric methods in capillary electrophoresis. Hoboken: John Wiley & Sons, 2010. 461 p.
- 29 GOUPY, J. y CREIGHTON, L. Introduction to Design of Experiments with JMP Examples, 3 Ed. Cary : SAS Institute Inc., 2007. 473 p.
- 30 Zeichner A. Recent developments in methods of chemical analysis in investigations of firearm-related events. *Anal Bioanal Chem.* 2003, 376, 1178–1191.
- 31 Koons, R. y Grant, D. Compositional Variation in Bullet Lead Manufacture. *J Forensic Sci.* 1998, 43(4), 748–754.
- 32 AEFI. Validación de métodos analíticos. Madrid, 2001. 311 p.
- 33 Ribani, M., *et al.* *Journal of Chromatography A*, 2007, 1156, (1–2), 201-205.
- 34 ISO 5725-1:1994 (NTC 3529-1), Exactitud (veracidad y precisión) de los métodos de medición y de los resultados. Parte 1: Principios generales y definiciones.
- 35 ISO 5725-4:2007 (NTC 3529-4), Exactitud (veracidad y precisión) de los métodos de medición y de los resultados. Parte 4: Métodos básicos para la determinación de la veracidad de un método de medición normalizado.
- 36 ISO 5725-2:1994 (NTC 3529-2), Exactitud (veracidad y precisión) de métodos de medición y resultados. Parte 2: método básico para la determinación de repetibilidad y reproducibilidad de un método normalizado de medición.
- 37 ISO 5725-6:2001 (NTC 3529-6), Exactitud (veracidad y precisión) de resultados y métodos de medición. Parte 6: utilización en la práctica de los valores de exactitud.

- 38 CNM-MRD-PT-030. MÉTODOS ANALÍTICOS ADECUADOS A SU PROPÓSITO, Guía de Laboratorio para la Validación de Métodos y Temas Relacionados. 2 ed. México CENAM 2005.
- 39 Dabrio, M. Cromatografía y electrophoresis en columna. Madrid: Springer – Verlag Ibérica, 2000. 287 p.
- 40 J.P. Quirino y S. Terabe. Electrokinetic chromatography. *J. Chromatogr. A.* 1999, 856, 465 – 482.